INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biochemikerin Lydia Haußmann

aus: Berlin

Tag der mündlichen Prüfung: 24. März 2009

Identifizierung und Charakterisierung von MEGAP-Interaktionspartnern

Gutachter: **Professor Dr. Herbert Steinbeißer**
Professor Dr. Gudrun Rappold

Im Rahmen dieser Dissertation wurden folgende Publikationen angefertigt:

Endris, V., **Haussmann, L.**, Rappold, G. (2009). Abl-dependent phosphorylation of MEGAP/srGAP3 affects its binding to WAVE-1. (submitted)

Haussmann, L., Endris, V., Bacon, C., Pinheiro, E., Gertler, F., Rappold, G. (2009). MEGAP inhibits actin dynamics and affects the localization of the Ena/VASP binding protein Lamellipodin. (in preparation)

Meinem Mann, Guido

Das Schönste, was wir erleben können, ist das Geheimnisvolle. Es ist das Grundgefühl, das an der Wiege von wahrer Kunst und Wissenschaft steht. Wer es nicht kennt und sich nicht wundern, nicht mehr staunen kann, der ist sozusagen tot und sein Auge erloschen.

Albert Einstein, Einstein sagt

Danksagungen

Frau Prof. Dr. Gudrun Rappold danke ich für die Überlassung des Themas, die Übernahme des Gutachtens, die gute Betreuung während der gesamten Arbeit sowie die konstruktive Kritik beim Schreiben der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Herbert Steinbeißer danke ich für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit an der Fakultät für Biowissenschaften der Universität Heidelberg und für die gute Beratung im Verlauf der Arbeit.

Dr. Volker Endris danke ich für die sehr gute praktische Betreuung, für die ständige Diskussionsbereitschaft und kritische Betrachtung meiner Arbeit sowie für die wertvollen Ratschläge beim Schreiben der Dissertation.

Dr. Claire Bacon danke ich für ihre Hilfe bei der RNA *in situ* Hybridisierung sowie für die Unterstützung beim Überarbeiten englischsprachiger Manuskripte.

Dr. Christine Fischer danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten des „Live Cell Imaging“.

Claudia Durand möchte ich für die hilfreichen Korrekturvorschläge bei der Überarbeitung des Manuskripts danken.

Allen meinen Kollegen und Freunden, die mich während meiner Zeit im Labor begleitet haben, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Kollegialität sowie für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Kooperationspartnern Dr. Elaine Pinheiro und Prof. Dr. Frank Gertler vom Massachusetts Institute of Technology für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Abschließend möchte ich in diesem Rahmen auch ganz herzlich meiner Familie danken, die mich immer uneingeschränkt unterstützt und gefördert hat.

Abkürzungen

AS	Aminosäure
ß-ME	ß-Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
C. elegans	*Caenorhabditis elegans,* Fadenwurm
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
E. coli	*Escherichia coli*
et al.	und andere
°C	Grad Celsius
g	Erdbeschleunigung
GAP	GTPase activating protein
GEF	Guanine exchange factor
GDP, GTP	Guanosindiphosphat, Guanosintriphosphat
h, min, sec	Stunden, Minuten, Sekunden
His	Histidin
kb	Kilobasen
l	Liter
LB	Luria Broth Medium
Lpd	Lamellipodin
M	Molar
Mb	Megabasen
MEGAP	Mental disorder associated GAP protein
mg, ml, mM	Milligramm, Milliliter, Millimolar
mRNA	*messenger* Ribonukleinsäure (Boten-RNA)
µg, µl	Mikrogramm, Mikroliter
MT	Mikrotubuli
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
OD_{600}	Optische Dichte bei 600 nm
OT	Objektträger
p.c.	*post coitum,* verwendet bei der Datierung von Embryonalstadien
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	*phosphate buffered saline* (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	*polymerase chain reaction* (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	*Potential hydrogenii* (negativer Logarithmus der Protonenkonzentration)
PIP3	Phosphatidylinositoltrisphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	*revolutions per minute* (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription - PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T_A	*Annealing*-Temperatur (Anlagerungstemperatur der Primer)
TBS	*Tris-buffered saline* (Tris-gepufferte Salzlösung)
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	*units* (Einheit der Aktivität von Enzymen)
Ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
WAVE-1	Wiskott-Aldrich Verprolin homology protein 1
(w/v)	*weight per volume* (Gewicht-Volumen-Verhältnis)

Zusammenfassung der Arbeit "Identifizierung und Charakterisierung von MEGAP Interaktionspartnern"

vorgelegt von: **Diplom-Biochemikerin Lydia Haußmann**
Betreuerin der Arbeit: **Professor Dr. Gudrun A. Rappold**

In der vorliegenden Arbeit wurde nach bisher unbekannten Interaktionspartnern für das mit geistiger Behinderung assoziierte Protein MEGAP gesucht. MEGAP/srGAP3 ist ein Mitglied der Slit-Robo GAP (srGAP) Familie und an der Slit/Robo-vermittelten repulsiven Wegfindung von Axonen und neuronalen Migration beteiligt. Durch die Inhibierung der kleinen Rho-GTPase Rac1 und der Interaktion mit WAVE-1 inhibiert MEGAP die Aktinpolymerisation.

Um die funktionelle Korrelation der Assoziationen zwischen MEGAP, dem Slit-Rezeptor Robo1 sowie weiteren MEGAP-Interaktionspartnern zu verstehen, wurde zu Beginn dieser Arbeit das Expressionsmuster der *Megap* und *Robo1* mRNA in verschiedenen Entwicklungsstadien der murinen Embryonalentwicklung untersucht. Die Expressionsstudien haben gezeigt, dass *Megap* in vielen Bereichen des sich entwickelnden Nervensystems exprimiert wird. Die Expression des *Megap* Transkripts wird bereits sehr früh (vor E9.5 p.c.) initiiert und konnte verstärkt in den stammzellreichen Regionen des Gehirns, im Neuralrohr, im neuronalen Gewebe des optischen Systems sowie in diversen Ganglien detektiert werden.

Für die Suche nach MEGAP-Interaktionspartnern wurden ein Yeast-Two-Hybrid Screen sowie GST-Pulldown Experimente durchgeführt. Im Rahmen des Yeast-Two-Hybrid Screens mit einem C-terminalen MEGAP-Fragment und einer humanen fötalen Gehirn cDNA-Bibliothek wurde das nukleäre Protein Periphilin als putativer Interaktionspartner isoliert. Die Bindung von MEGAP an Periphilin über die MEGAP-SH3 Domäne konnte jedoch nicht bestätigt werden.

GST-Pulldown Experimente mit Proteinextrakten aus HEK293 Zellen sowie adultem Mausgehirn wiesen auf eine Interaktion zwischen der MEGAP-SH3 Domäne und dem Formin mDia1 sowie dem Ena/VASP bindenden Protein Lamellipodin (Lpd) hin.

In dieser Arbeit wurde die Assoziation zwischen MEGAP und Lpd nachgewiesen. Anhand von Co-IP Studien konnte die Interaktion zwischen MEGAP und Lpd sowohl *in vitro* als auch für die endogen exprimierten Proteine *in vivo* verifiziert werden. Hierbei stellt die Funktionalität der MEGAP-SH3 Domäne einen essentiellen Faktor für die Bindung von MEGAP an Lpd dar. Expressionsstudien zeigten weiterhin eine Co-Expression der *Megap* und *Lpd* mRNA während der murinen Embryonalentwicklung u.a. in Bereichen des Hinterhirns sowie in den trigeminalen Ganglien auf. In NIH-3T3 Mausfibroblasten co-lokalisierten MEGAP und Lpd verstärkt an Fokalen Adhäsionen sowie an der Zellmembran. Nur unter Co-Expression von MEGAP wurde Lpd an Fokalen Adhäsionen detektiert. Mit Hilfe von „Live Cell Imaging"-Analysen wurde gezeigt, dass MEGAP, unabhängig von seiner GAP-Aktivität, einen inhibierenden Effekt auf Lpd und damit verbundene Lamellipodien-Dynamik ausübt. Die Verwendung der MEGAP-SH3-Mutante Y755D demonstrierte, dass ein Verlust der Interaktion zwischen MEGAP und Lpd nicht nur die Co-Lokalisation der beiden Proteine an Fokale Adhäsionen unterbindet sondern auch die Ausbildung kleiner Lamellipodien trotz verbleibender GAP-Aktivität ermöglicht. Somit kann angenommen werden, dass MEGAP die Dynamik von Lamellipodien durch die Rekrutierung von Lpd an Fokale Adhäsionen hemmt.

Summary of the work „Identification and characterization of MEGAP interaction partners“

presented by: **Diplom-Biochemikerin Lydia Haußmann**
Supervisior: **Professor Dr. Gudrun A. Rappold**

This work focused on the search for novel MEGAP interaction partners, a protein associated with severe mental retardation. MEGAP/srGAP3 is a member of the Slit-Robo GAP (srGAP) family and is involved in repulsive axon guidance and neuronal migration via Slit-Robo-mediated signal transduction. Affecting particularly the activity of Rac1 and binding to the WASP-related protein WAVE1, MEGAP has previously been shown to inhibit actin polymerisation.

To understand the functional correlation of the interactions between MEGAP, the Slit-receptor Robo1 and further MEGAP interaction partners, at the beginning of this work mRNA expression patterns of *Megap* and *Robo1* were investigated at different developmental stages of the murine embryonic development. These studies have shown the expression of *Megap* in many regions of the developing nervous system. The expression of the *Megap* transcript is initiated early during embryonic development (before E9.5 p.c.) and was detected especially in the stem cell rich areas of the brain, in the neural tube, in the neuronal tissue of the optic system as well as in various ganglia.

In order to search for novel MEGAP interaction partners a Yeast-Two-Hybrid screen and GST-Pulldown experiments were carried out. During the Yeast-Two-Hybrid screen with a C-terminal MEGAP fragment and a human fetal brain cDNA library the nuclear protein Periphilin was isolated as a putative interaction partner. However, the binding of MEGAP to Periphilin via the MEGAP-SH3 domain could not be confirmed.

GST-Pulldown experiments with protein extracts of HEK293 cells and adult mouse brain indicated an interaction between the MEGAP-SH3 domain and the formin mDia1 as well as the Ena/VASP binding protein Lamellipodin (Lpd).

In this work, the associativity between MEGAP and Lpd was proven. By means of Co-IP studies the interaction between MEGAP and Lpd was verified both *in vitro* and for the endogenously expressed proteins *in vivo*. Here it was shown that the binding of MEGAP to Lpd depends on an intact MEGAP-SH3 domain. Furthermore, expression studies revealed the co-expression of *Megap* and *Lpd* mRNA for instance in some areas of the hindbrain and the trigeminal ganglia during the murine embryonic development. In NIH-3T3 mouse fibroblasts MEGAP and Lpd co-localized especially at focal adhesions as well as the cell membrane. Lpd was only detected at focal adhesion sites under co-expression of MEGAP. Live cell analyses revealed that MEGAP inhibits Lpd-evoked lamellipodial dynamics independently of its GAP activity. Furthermore it was demonstrated that loss of the interaction between MEGAP and Lpd, using the SH3-mutant Y755D, not only prevents the co-localization of both proteins at focal adhesions but also facilitates the formation of small lamellipodial protrusions despite the remaining GAP-activity. Together, these results show that MEGAP inhibits lamellipodial dynamics possibly by relocating Lpd to focal adhesion sites.

1 Einleitung

1.1 Migrationsprozesse als Motor der Entwicklung und Adaption

Eine zentrale Gemeinsamkeit aller biologischen Organismen besteht in der Anpassungsfähigkeit an ihre jeweilige Umwelt. Zu Beginn der Evolution besaßen bereits einzellige Lebewesen die Fähigkeit, auf spezifische Faktoren in ihrer Umgebung in Form von zielgerichteter oder zielabgewandter Bewegung zu reagieren. Dieser Prozess der gesteuerten Zellbewegung (Migration) nimmt auch in den höher organisierten, mehrzelligen Organismen bis hin zum Menschen eine wichtige Rolle in diversen physiologischen und pathologischen Prozessen ein.

1.1.1 Die Embryogenese in Vertebraten

Besonders während der frühen Embryonalentwicklung stellt die koordinierte Zellmigration die Basis für die Entstehung von Geweben und Organen dar. Im Unterschied zur zweidimensionalen Umgebung eines Zellkultursystems müssen sich die migrierenden Zellen und Zellverbände innerhalb einer dreidimensionalen extrazellulären Matrix mit distinkten physikalischen und chemischen Eigenschaften orientieren und korrekt positionieren. Im sich entwickelnden Embryo wird die Zellmigration also durch das Zusammenspiel extra- und intrazellulärer Signale, welche Zeitpunkt, Richtung und den endgültigen Bestimmungsort der jeweiligen Zellpopulation festlegen, präzise koordiniert. Des Weiteren reguliert die Beschaffenheit der extrazellulären Matrix auch die Geschwindigkeit der wandernden Zellen.

Im Verlauf der Embryogenese finden zwei grundverschiedene Arten der Zellwanderung statt, wobei die beteiligten Zellen sich aufgrund ihrer Morphologie voneinander abgrenzen. So wandern epitheliale Zellen ausschließlich in Form von großen Zellverbänden und legen nur kurze Strecken innerhalb des Embryos zurück. Ein wichtiges Beispiel für die Migration epithelialer Zellen ist die konvergente Extension, welche besonders in Organismen wie Fischen und Amphibien eine Rolle spielt, deren Größe im Verlauf der frühen Embryonalentwicklung keiner drastischen Änderung unterliegt (Keller *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu bewegen sich die mesenchymalen Zellen verschiedener Linien jeweils als unabhängige Einheiten und tragen zur Generierung von Geweben und Zelltypen im gesamten Organismus bei. Der Ursprung der mesenchymalen Zellen liegt jedoch auch innerhalb von

proliferativen, epithelialen Zellschichten (z. B. Ektoderm des frühen Embryos oder die Zellschichten des Neuralrohrs). Erst während sich bestimmte Zellen aus der epithelialen Schicht ablösen, findet ein Übergang von epithelialen zu mesenchymalen Charakteristika statt (Locascio and Nieto, 2001). Eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Transformation epithelialer Zellen zu einem mesenchymalen Phänotyp ist die Änderung der interzellulären Adhäsionseigenschaften.

Im Verlauf der Histo- und Organogenese können distinkte Migrationspfade mesenchymaler Zellen beobachtet werden (vgl. Abbildung 1), wobei u.a. die Migrationsströme der Neuralleistenzellen (Sauka-Spengler and Bronner-Fraser, 2008) und der neuronalen Vorläuferzellen (siehe Abschnitt 1.1.3) eine sehr wichtige Rolle einnehmen.

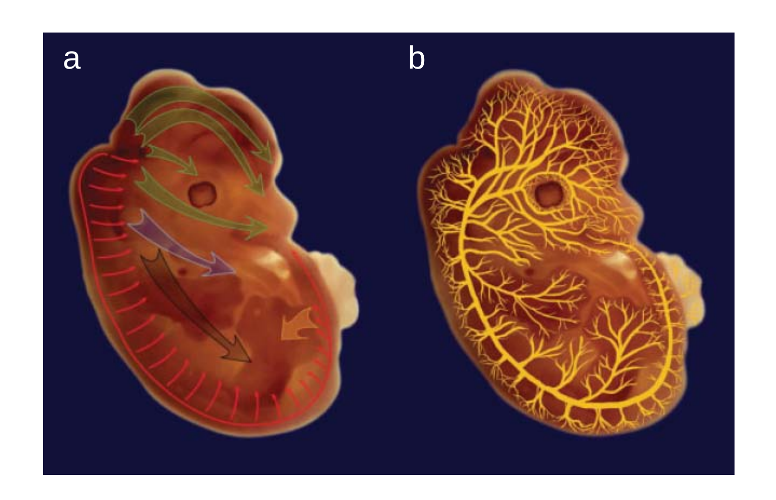


Abbildung 1: Migrationspfade der Neuralleistenzellen (a) und der Vorläuferzellen des Nerven- und Blutgefäßsystems (b) im Mausembryo (Darstellung bei Embryonalstadium E13.5 p.c.), (Kurosaka and Kashina, 2008).

1.1.2 Migration auf zellulärer Ebene – Regulation des Zytoskeletts

Die gerichtete Zellmigration bildet die Basis für die korrekte Entwicklung und Funktion von sowohl ein- als auch mehrzelligen Organismen. Trotz der Unterschiede zwischen den diversen Zelltypen und den jeweiligen Migrationsereignissen wird angenommen, dass allen Migrationsvarianten ein ähnlicher molekularer Mechanismus zugrunde liegt, dessen Hauptkomponenten im Verlauf der Evolution über mehrere Millionen Jahre konserviert wurden. Da die Charakteristika mesenchymaler Zellen dem allgemeinen Phänotyp von Fibroblastenzellen sehr ähnlich sind, wurden viele Aspekte der gerichteten Zellbewegung im Zellkultursystem analysiert.

Die Form einer Zelle wird durch drei verschiedene Polymersysteme bestimmt, aus denen sich das Zytoskelett zusammensetzt: den Aktinfasern, den Mikrotubuli (MT) sowie den Intermediärfilamenten (Abbildung 2). Nur aufgrund der Reorganisation dieser Polymersysteme können Änderungen der Morphologie einer Zelle und Migrationsprozesse stattfinden, welche einen Organismus formen und somit eine der Grundlagen des Lebens darstellen.

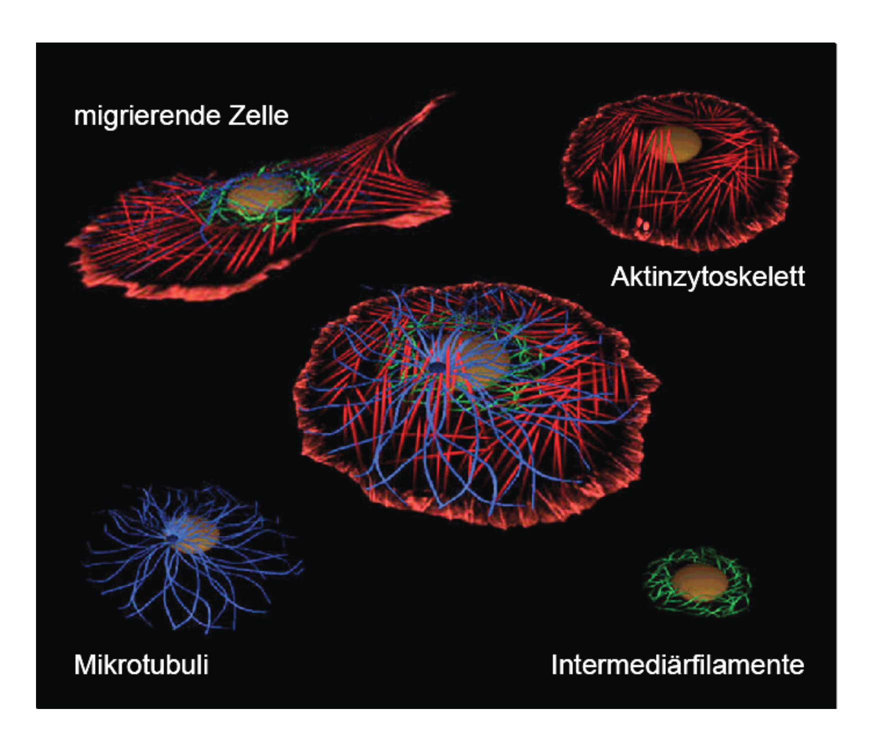


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zytoskeletts einer Zelle im Zellkultursystem. In rot, blau und grün sind die drei Hauptkomponenten des Zytoskeletts dargestellt: Aktin, Mikrotubuli und Intermediärfilamente. Modifiziert nach „A Video Tour of Cell Motility“.

Die Migration einer Zelle kann als zyklischer Prozess betrachtet werden (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Dieser beginnt mit der Antwort auf ein extrazelluläres Signal, welches zur Polarisierung der Zelle und der Ausbildung einer Migrationsfront („leading edge“) mit dynamisch auswachsenden Zellfortsätzen sowie einer Rückzugsfront („trailing edge“) führt (Pollard and Borisy, 2003; Ridley *et al.*, 2003). Die Strukturen, welche die Aktivität der Migrationsfront definieren, sind die Lamella, Lamellipodien und Filopodien (Abbildung 3). Die Lamella ist eine breite, hoch aktive Zone, welche die Fläche hinter der eigentlichen Migrationsfront einnimmt. In diesem Bereich der Zelle findet ein Großteil der mechanistischen und regulatorischen Ereignisse statt, die für das Auswachsen von Zellfortsätzen und somit für die Migration der Zelle verantwortlich sind.

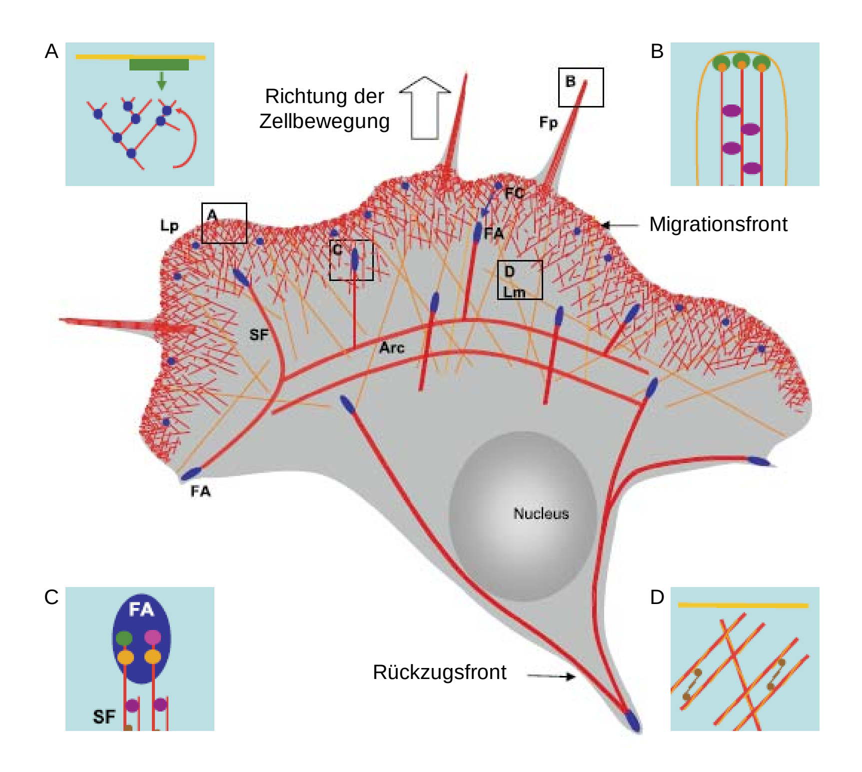


Abbildung 3: Darstellung des Aktinzytoskeletts in einer migrierenden Zelle. A) In auswachsenden **Lamellipodien** (Lp) wird über Arp2/3-WAVE-Signaltransduktionskaskaden ein stark verzweigtes Aktin-Netzwerk generiert. **B)** Zur Wahrnehmung der unmittelbaren Umgebung bilden die Zellen **Filopodien** (Fp), welche aus gebündelten Aktinfasern bestehen. **C) Fokale Adhäsionen** (FA) dienen als Verbindung zwischen extrazellulärer Matrix und Aktin-Stressfasern (SF) **D)** Innerhalb der **Lamella** (Lm) sind Myosin II und Tropomyosin mit Aktinfasern verankert. Modifiziert nach Le Clainche and Carlier, 2008.

Der Migrationszyklus einer Zelle kann in vier Schritte untergliedert werden: Polarisierung, Auswachsen von Zellfortsätzen an der Migrationsfront („protrusion"), Bildung neuer Adhäsionen („adhesion") und Rückzug des hinteren Teils der migrierenden Zelle („retraction").

Um sich in eine bestimmte Richtung bewegen zu können, muss sich die Zelle zunächst polarisieren, d.h., sich in eine Vorderseite mit Migrationsfront und eine rückwärtige Seite einteilen. Die wichtigsten Regulatoren des Polarisierungsprozesses sind die kleine Rho-GTPase Cdc42, die Par Proteine und die atypische Protein-Kinase (aPKC) (Ridley *et al.*, 2003). Zusätzliche Polarisierungssignale werden zum Beispiel durch einen Gradienten an Phosphatidylinositoltrisphosphat (PIP3) vermittelt, welcher zum hinteren Teil der Zelle hin abnimmt. Als Antwort auf extrazelluläre Stimuli wird PIP3 durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) synthetisiert und durch die PIP3 Phosphatase PTEN abgebaut. Im hinteren Bereich der Zelle ist die erhöhte Aktivität von PTEN mit der Aktivität des Aktin-abhängigen Motorproteins Myosin II korreliert, welches die Kontraktion der Rückzugsfront in Richtung

der Zellbewegung gewährleistet. Aktuelle Studien haben gezeigt, dass, entgegen früherer Annahmen, Signale für die Zellpolarisierung in der Nähe des Zellkerns und an der zukünftigen Rückzugsfront initiiert werden (Yam *et al.*, 2007).

Die Ausbildung von Zellfortsätzen ist der eigentliche Beginn des Migrationszyklus einer Zelle. Die mechanische Triebkraft für die Bewegung der Migrationsfront wird durch die Polymerisation von Aktinfilamenten bereitgestellt. Diese bilden entweder parallele Bündel oder ein stark verzweigtes Netzwerk zur Generierung von Filopodien bzw. Lamellipodien (Pollard and Borisy, 2003; Le Clainche and Carlier, 2008). In beiden Fällen wird durch die Anlagerung von Aktin-Monomeren an die schnell wachsenden „barbed" Enden von Aktinfilamenten eine mechanische Kraft generiert, welche die Zellmembran in die Richtung der Migration drückt. Im Verlauf der Zellbewegung werden die Aktinfasern innerhalb der Migrationsfront an ihrem hinteren, langsam wachsenden „pointed" Ende kontinuierlich abgebaut. Diese Maschinerie aus Aktinpolymerisation und Depolymerisation wird auch häufig als Aktin-Tretmühle („actin treadmill") bezeichnet (Abbildung 4). In solch einer Konstellation ist die Kraft der Aktinpolymerisation an der Migrationsfront an den Abbau der Aktinfilamente im hinteren Bereich des Lamellipodiums gekoppelt. Dieser Prozess treibt die Zelle voran (Watanabe and Mitchison, 2002; Ponti *et al.*, 2004).

Die Zusammenlagerung der zwei verschiedenen Aktinstrukturen wird durch unterschiedliche Initiierungsprozesse erreicht (Pollard, 2007). Der erste Mechanismus wird über den Arp2/3 Komplex vermittelt, welcher mit der Oberfläche existierender Aktinfilamente interagiert und somit neue Keime für die Anlagerung von Aktin-Monomeren (G-Aktin) bildet. Das durch diesen Prozess generierte, stark verzweigte Aktin-Netzwerk bildet die Basis für das Auswachsen von Lamellipodien. Der zweite Mechanismus wird von den Mitgliedern der Proteinfamilie der Formine gesteuert, welche die Aktin-Zusammenlagerung in Form von parallelen, quervernetzten Bündeln vorantreiben. Diese Strukturen liegen der Ausbildung von Filopodien zugrunde (Mattila and Lappalainen, 2008).

Die kleinen GTPasen der Rho-Familie mit den Hauptvertretern RhoA, Rac1 und Cdc42 nehmen eine vorherrschende Rolle in den Signaltransduktionskaskaden ein, welche die Ausbildung von Zellfortsätzen während der Migration regulieren (Charest and Firtel, 2007). Wenn die GTPasen an GTP gebunden sind, liegen sie in aktiviertem Zustand vor und interagieren mit diversen Effektoren wie zum Beispiel den Aktivatoren des Arp2/3 Komplexes (vgl. Abschnitt 1.3.1). Die wichtigste Rolle nehmen in diesem Zusammenhang Rac1 und Cdc42 ein, deren Zielproteine aus der WASP/WAVE-Familie den Arp2/3 Komplex aktivieren, der die Polymerisation von verzweigtem Aktin steuert. Zusätzlich spielen auch die

Aktin-assoziierten Ena/VASP Proteine eine wesentliche Rolle in der Regulation von Aktin-Dynamiken (Krause *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass Ena/VASP Proteine die Wachstumsgeschwindigkeit von Lamellipodien erhöhen, aber auch die Generierung von Aktin-Verzweigungen durch den Arp2/3 Komplex hemmen (Trichet *et al.*, 2008). Die genauen biochemischen Mechanismen, mit welchen die Ena/VASP Proteine das Aktinzytoskelett beeinflussen, sind jedoch bisher nur ansatzweise verstanden.

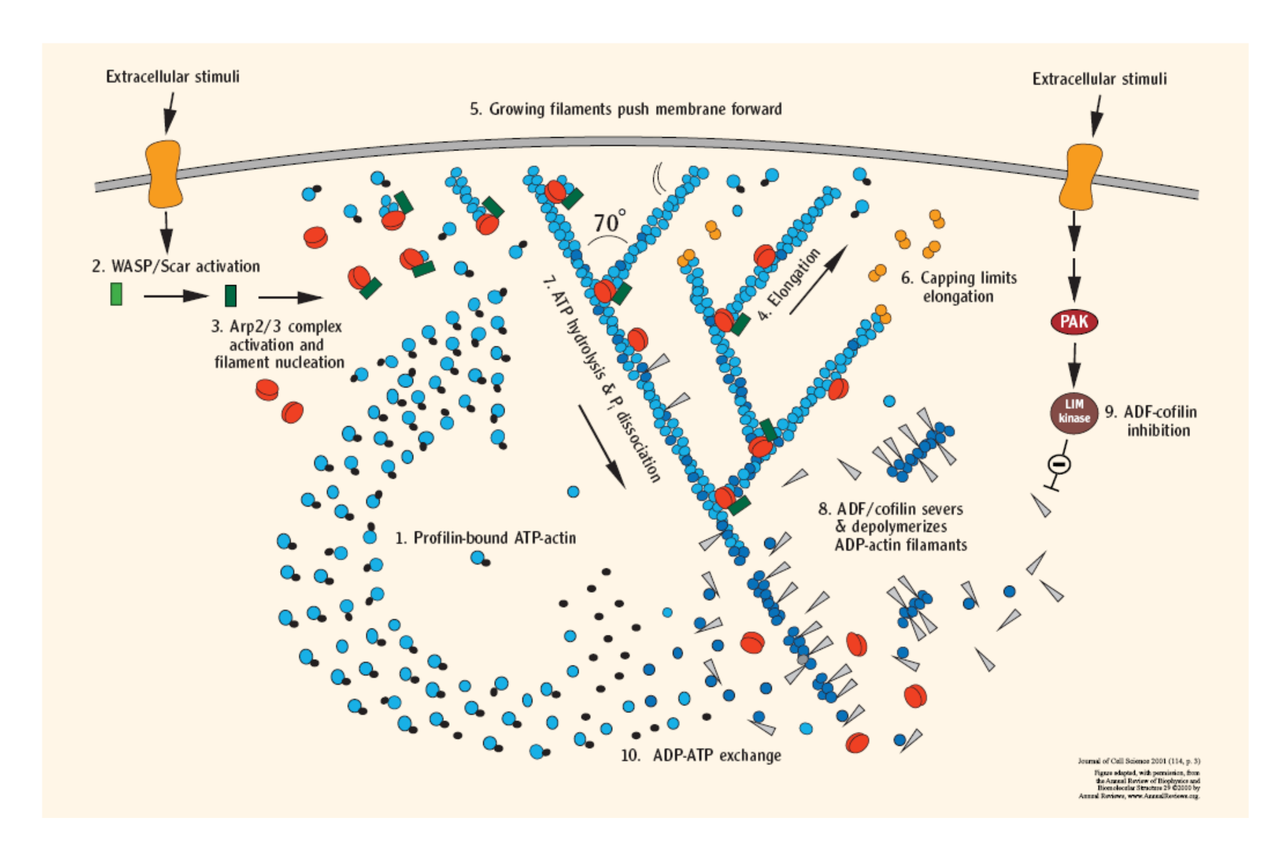


Abbildung 4: Darstellung der „Aktin-Tretmühle" innerhalb eines auswachsenden Lamellipodiums. 1.) Ein Pool an Profilin-gebundenem ATP-Aktin steht für die Verlängerung von Aktinfilamenten zur Verfügung. **2.)** Extrazelluläre Signale initiieren die Aktivierung der kleinen Rho-GTPasen und somit die Aktivierung des WAVE-Komplexes. **3.)** Aktives WAVE stimuliert die katalytische Aktivität des Arp2/3 Komplexes, welche die Bildung neuer Verzweigungen im Aktin-Netzwerk ermöglicht. **4.)** Ausgehend von der neuen Verzweigung findet ein schnelles Wachstum der Aktinfilamente an den „barbed" Enden statt. **5.)** Die wachsenden Filamente drücken die Zellmembran vorwärts. **6.)** So genannte Capping Proteine unterbinden weitere Anlagerung von Aktin-Monomeren. **7.)** Die Aktinfilamente „altern" durch Hydrolyse von ATP, welches an jede Untereinheit gebunden ist. **8.)** ADF/Cofilin baut ADP-Aktinfilamente ab. **9.)** Die Rho-GTPasen aktivieren PAK und LIM Kinasen, welche ADF/Cofilin phosphorylieren und dadurch den Aktinumsatz verlangsamen. **10.)** Profilin katalysiert den Austausch von ADP gegen ATP. Dadurch stehen abgebaute Aktin-Monomere erneut für die Verlängerung von Aktinfilamenten bereit. Modifiziert nach Pollard and Borisy, 2003; Pollard, 2007.

Nachdem sich ein Zellfortsatz an der Migrationsfront gebildet hat, muss dieser zur Stabilisierung der auswachsenden Zellmembran mit der extrazellulären Matrix eine Bindung eingehen. Die neu gebildeten Adhäsionsstellen dienen anschließend als Ankerpunkte für die Vorwärtsbewegung der Zelle. Eine zentrale Rolle bei der Adhäsion an die extrazelluläre

Matrix nehmen die Integrine ein, Transmembranproteine, welche indirekt an die intrazellulären Enden von Aktin-Stressfasern binden und gleichzeitig mit Proteinen der extrazellulären Matrix (zum Beispiel Fibronektin) interagieren. Integrine sind Heterodimere und setzen sich aus verschiedenen Kombinationen an α - und β – Ketten zusammen. Diese Variierung der Proteinzusammensetzung ist für die differenzierte Interaktion mit unterschiedlichen extrazellulären Matrixproteinen verantwortlich (Lock *et al.*, 2008). Die Bindung der Integrine an ihre Liganden löst eine Konformationsänderung aus, welche intrazelluläre Signalkaskaden an der Migrationsfront und innerhalb der Lamella aktiviert. Die Aktivierung von Integrinen auf der zytoplasmatischen Seite wird durch die Bindung von Talin vermittelt und involviert auch die Protein-Kinase-C (PKC), kleine GTPasen und PI3K-Signaltransduktionswege (Arnaout *et al.*, 2007). Im Anschluss an die Aktivierung lagern sich Integrinkomplexe zusammen und rekrutieren weitere Struktur- und Signalproteine (wie zum Beispiel Vinculin), um die Adhäsionskontakte zu stabilisieren und später ausgereifte Fokale Adhäsionen innerhalb der Lamella zu bilden (Abbildung 5).

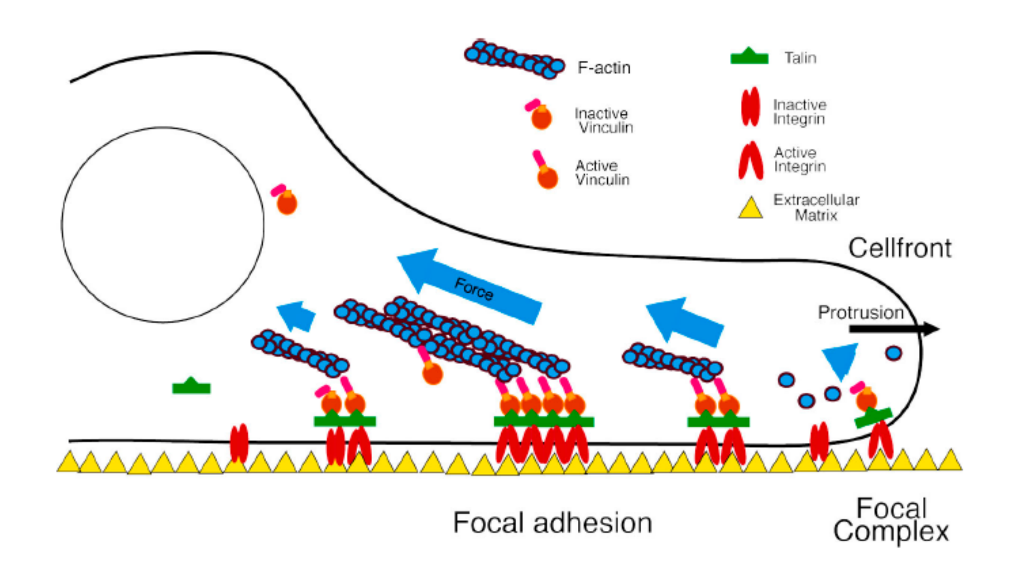


Abbildung 5: Regulation Fokaler Adhäsionen durch Vinculin. Über niedrig-affine Bindungen wird Vinculin an das Integrin-bindende Protein Talin rekrutiert (Fokale Komplexe) und durch Interaktion zum Beispiel mit Aktin aktiviert. Die Aktivierung von Vinculin führt zu einer Konformationsänderung und einer höher-affinen Bindung an Talin. Dies stabilisiert die „aktive“ Konformation der Integrine und fördert somit Stabilisierung und Wachstum Fokaler Adhäsionen (FA). Die Destabilisierung der FA erfolgt u.a. über den Abtransport von Aktin („retrograde flow“) und somit Vinculin. Sofern Vinculin im Verlauf der Bildung Fokaler Komplexe nicht aktiviert wird, werden diese sehr schnell wieder abgebaut Humphries *et al.*, 2007.

Während sich die Zelle vorwärts bewegt, lösen sich einige Fokale Adhäsionen auf und die Zelle beginnt eine neue Phase des Migrationszyklus. Die Zelle bildet neue Fortsätze aus, die wieder durch Adhäsionskontakte an der Migrationsfront stabilisiert werden. Für eine

gerichtete Vorwärtsbewegung müssen nicht nur Zellfortsätze gebildet und stabilisiert, sondern ein Teil der generierten Adhäsionskontakte wieder aufgelöst und das hintere Ende der Zelle von der Matrix gelöst werden. Der koordinierte Auf- und Abbau Fokaler Adhäsionen wird u.a. durch das Mikrotubuli-Netzwerk reguliert. Insbesondere die Auflösung Fokaler Adhäsionen wird durch die zielgerichtete Lokalisation von Mikrotubuli an die Adhäsionen initiiert. Dies erfolgt zunächst durch Destabilisierung der Adhäsion durch mechanischen Spannungsabbau der Aktin-Stressfasern und assoziiertem Myosin. Im Anschluss daran lösen sich die Komponenten der Adhäsion über Kontraktion der Aktin-Fasern oder Endozytose vom Substrat (Broussard *et al.*, 2008).

1.1.3 Neuronale Migration und die Wegfindung von Axonen

Eine außergewöhnliche Art der Zellmigration stellt die Musterbildung innerhalb des sich entwickelnden Nervensystems dar. Obwohl während der Proliferation und Migration neuronaler Vorläuferzellen und Neuronen die gleichen Migrationsmechanismen wie bei anderen mesenchymalen Zellen angewendet werden, findet nach der Differenzierung eine stationäre Positionierung der neuronalen Zellkörper innerhalb des sich entwickelnden Nervensystems statt. Im Anschluss daran setzen nur die Neuriten die Wanderung durch den Organismus fort, um ihre spezifischen Ziele zu erreichen und mit den jeweiligen Effektoren Verknüpfungen einzugehen.

Ähnlich der Migration mesenchymaler Zellen wird die neuronale Migration durch die Umstrukturierung des Zytoskeletts als Antwort auf extrazelluläre Signale und deren Übermittlung durch intrazelluläre Signalkaskaden erreicht. Die epithelialen Schichten der ventrikulären Zonen sind die Geburtsorte der neuronalen Vorläuferzellen und Neuronen im sich entwickelnden Nervensystem. Durch asymmetrische Zellteilung innerhalb der ventrikulären Zone beginnt die Differenzierung zu einem neuronalen Phänotyp. Nachdem eine neuronale Zelle aus dem Zellzyklus ausgetreten ist, muss sie aus der ventrikulären Zone herauswandern. Über diesen Mechanismus werden die Strukturen des Nervensystems gebildet. Bei der neuronalen Migration können zwei Arten definiert werden: radiale Migration, bei der Zellen aus den ventrikulären Zonen in Richtung der Oberfläche des Gehirns wandern, und die tangentiale Migration, bei welcher Zellen senkrecht zur Migrationsrichtung radial migrierender Zellen wandern (Marin and Rubenstein, 2003). Mit Hilfe der radialen Migration entstehen die laminaren Strukturen des zerebralen und zerebellaren Kortex sowie Striatum, Thalamus und Rückenmark. Hierbei existieren zwei

verschiedene Modi der Zellbewegung: somale Translokation und die kontinuierliche Fortbewegung der ganzen Zelle („locomotion“) (Rakic, 1972; Nadarajah *et al.*, 2001). Bei der somalen Translokation streckt die Zelle zunächst einen langen Fortsatz mit verzweigtem Ende in Richtung der Migration aus, welcher sich an die Oberfläche des Gehirns anheftet. Durch Kontraktion dieses Fortsatzes wird der Zellkörper anschließend nachgezogen (Miyata *et al.*, 2001; Tamamaki *et al.*, 2001). Neuronen, welche mit Hilfe der „locomotion“ wandern, bilden kürzere unverzweigte Fortsätze, deren Länge während der Migration relativ konstant bleibt (Abbildung 6). Radial migrierende Neuronen orientieren sich anhand der Projektionen radialer Gliazellen. Hierbei handelt es sich um neuronale Vorläuferzellen, welche einen Zellkörper innerhalb der ventrikulären Zone sowie einen langen, bis zur Oberfläche des Gehirns reichenden Fortsatz besitzen. Die tangentiale Migration findet bei GABAergen Interneuronen und einigen Oligodendrozyten statt. Tangential migrierende Neuronen werden auch als neurophil bezeichnet, da sie sich nicht an den Fortsätzen radialer Gliazellen sondern durch Signalaustausch untereinander und durch die Wahrnehmung extrazellulärer Signale orientieren (Marin and Rubenstein, 2001).

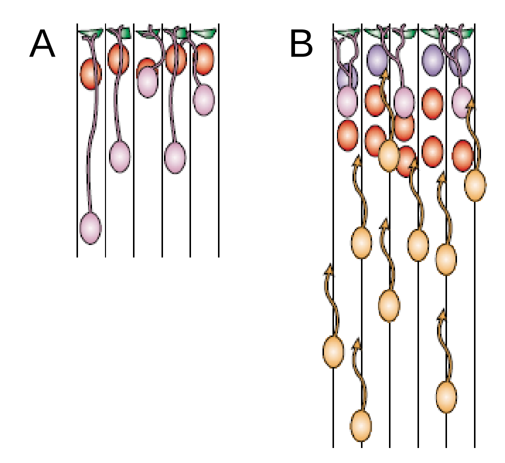


Abbildung 6: Mechanismen der radialen Migration: somale Translokation (A) und „Locomotion“ (B). Modifiziert nach Gupta *et al.*, 2002.

Ein allgemeines Modell der neuronalen Migration beschreibt einen Zyklus aus drei Schritten. Zuerst streckt die Zelle zur Orientierung einen Fortsatz aus („leading neurite“), an dessen Ende sich der so genannte Wachstumskegel („growth cone“) befindet. Mit Hilfe des Wachstumskegels untersucht das Neuron aktiv die direkte Umgebung und bestimmt somit die Migrationsrichtung in Abhängigkeit von extrazellulären Signalen. Der nächste Schritt besteht in der Translokation des Zellkerns in Richtung des „leading neurite“. Abschließend wird das hintere Ende der Zelle nachgezogen.

Analog zu der Migration mesenchymaler Zellen ist bei der neuronalen Migration die Regulation des Zytoskeletts essentiell. Hierbei findet ein eng verwobenes Zusammenspiel zwischen Komponenten des Aktin-Netzwerkes und der Mikrotubuli statt. Dies kann anhand der Wegfindung des „leading neurite" veranschaulicht werden. Das Auswachsen dieses Fortsatzes wird durch die Verlängerung gebündelter Mikrotubuli ermöglicht, welche auch das Zentrum des Wachstumskegels bilden. Der äußere Bereich des Wachstumskegels wird hauptsächlich durch das Aktinzytoskelett geformt. Aufgrund dieser distinkten Zusammensetzung kann der Wachstumskegel in eine periphere Zone mit Aktinfilamenten, eine Übergangszone sowie in eine zentrale Zone eingeteilt werden (Abbildung 7).

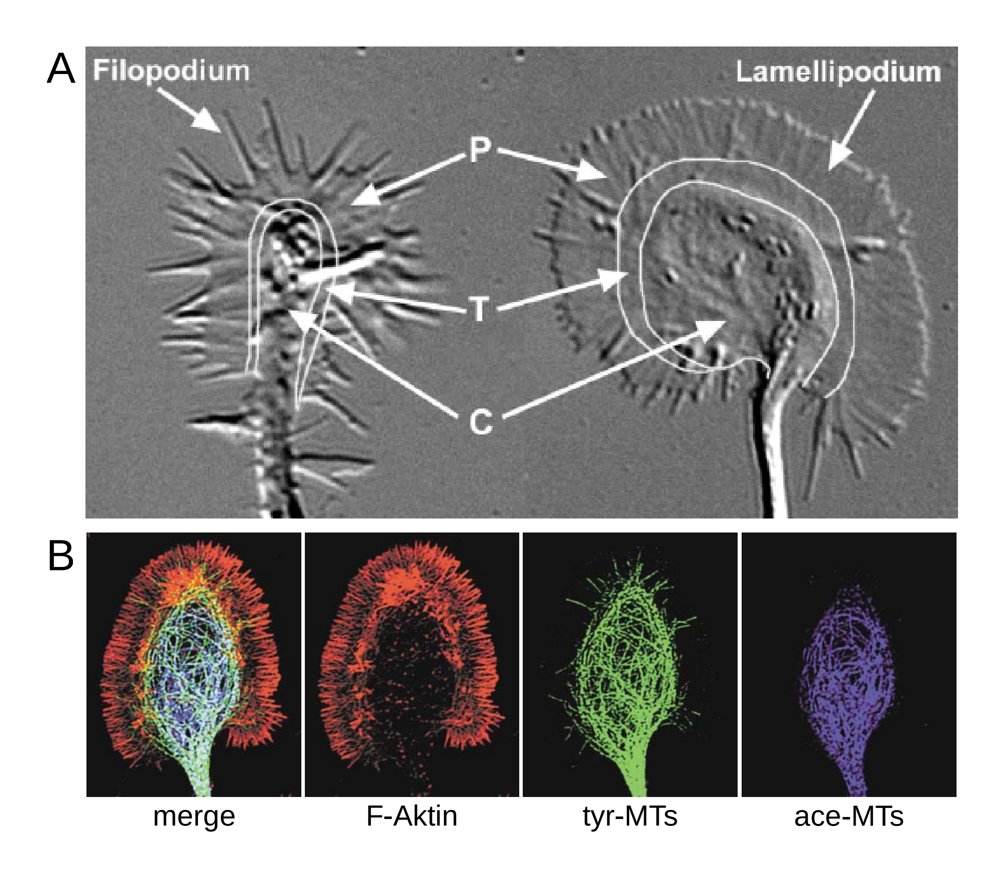


Abbildung 7: A) Darstellung hippokampaler Wachstumskegel mit ausgeprägter Filopodien- bzw. Lamellipodienbildung. Im Normalfall findet ein reguliertes Zusammenspiel beider Aktinstrukturen statt. P – periphere Zone, T- Übergangszone, C – zentrale Region des Wachstumskegels **B)** Komposition eines pausierenden hippokampalen Wachstumskegels aus Aktinfilamenten (rot) und Mikrotubuli (MT; grün, blau). Die Mikrotubuli stellen das Zentrum des Wachstumskegels dar. Post-translationale Modifizierungen der Tubulin-Untereinheiten wie Tyrosinierung (tyr) oder Acetylierung (ace) modifizieren deren Funktion. Die sich verlängernden Plus-Enden von Mikrotubuli (tyr-MTs) assoziieren auch mit Aktinfilamenten in der peripheren Zone. Modifiziert nach Dent and Gertler, 2003.

Der Wachstumskegel stellt eine hoch dynamische Struktur dar, welche durch die Generierung und den Abbau von Filopodien und Lamellipodien entsteht. Durch die Interaktion zwischen extrazellulären Signalen/Liganden und Transmembranrezeptoren werden innerhalb des

Wachstumskegels Signalkaskaden initiiert, welche die Organisation des Zytoskeletts beeinflussen und folglich zu einer Polarisierung des Wachstumskegels führen. Somit wächst der „leading neurite“ in die Richtung aus, wo Signale für die verstärkte Polymerisation von Aktin und Mikrotubuli detektiert werden können.

Die Wegfindung von Wachstumskegeln spielt nicht nur bei der neuronalen Migration eine wichtige Rolle sondern auch während des Auswachsens von Axonen, nachdem die neuronalen Zellkörper ihre Zielposition erreicht haben. Dieser Prozess ist essentiell für den Aufbau einer Vielzahl neuronaler Verknüpfungen bzw. Synapsen sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem. Ein Hauptmechanismus stellt in diesem Zusammenhang die Chemotaxis dar, wobei die Wachstumskegel molekulare Gradienten detektieren und diesen folgen (Abbildung 8). Die Signalmoleküle können sowohl abstoßende als auch attraktive Effekte auf die Migration des Wachstumskegels haben, indem sie Signaltransduktionskaskaden aktivieren, die entweder die Degradation von Aktin und Mikrotubuli initiieren oder deren Polymerisation befördern. Wichtige Vertreter dieser Signalmoleküle gehören u.a. zu den Proteinfamilien der Netrine, Semaphorine, Slits und Ephrine (Dickson, 2002; Plachez and Richards, 2005).

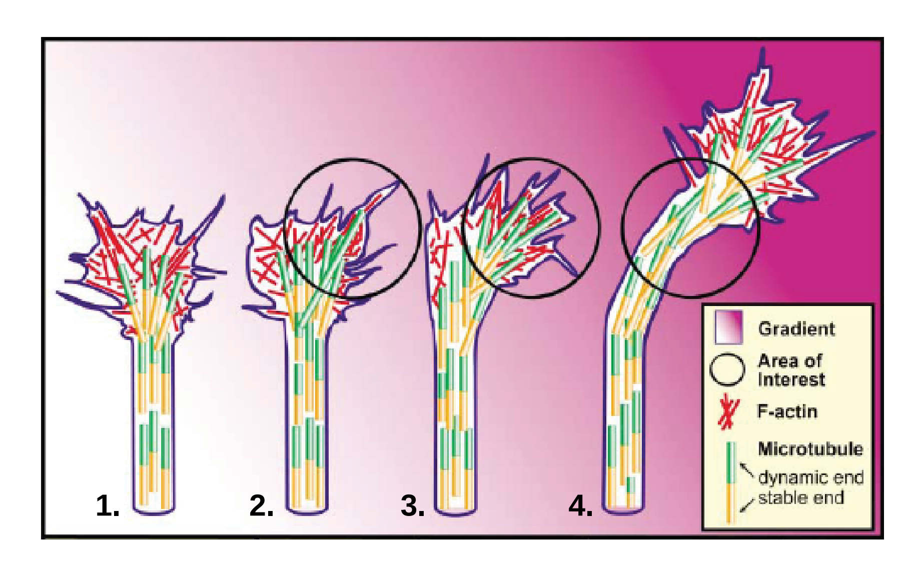


Abbildung 8: Orientierung des Wachstumskegels anhand eines attraktiven Gradienten. **1.)** Gleichmäßige Verteilung von Filopodien und Lamellipodien. Im Axonschaft liegen die MT stark gebündelt vor, deren Struktur sich im Wachstumskegel auflockert und ausbreitet. **2.)** Nach der Detektion des Signals findet selektive Aktinpolymerisation in Richtung des Gradienten statt, vermehrte Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien (am anderen Ende Aktinabbau). Die MT-Enden werden in Aktin-reichen Regionen transient gebunden und durch Interaktion mit F-Aktin-Bündeln stabilisiert. **3.)** Anzahl und Größe der F-Aktin-Bündel nimmt zu, welche durch Aktin-bindende Proteine und Adhäsionskontakte mit der extrazellulären Umgebung stabilisiert werden. In der Aktin-reichen Seite werden MT weiter stabilisiert und verlängert. **4.)** Aktinfasern werden teilweise degradiert oder durch Capping-Proteine stabilisiert. MT werden durch MT-bindende Proteine stabilisiert und zu einem verlängerten, neu orientierten Axonschaft gebündelt. Modifiziert nach Dent and Gertler, 2003.

1.1.4 Mentale Retardierung als Folge neuronaler Migrationsdefekte

Mentale Retardierung, oder auch Geistige Behinderung, tritt mit einer Prävalenz von 2-3% in der westlichen Bevölkerung auf. Dieses vielschichtige Krankheitsbild beschreibt im Allgemeinen eine Verzögerung der geistigen Entwicklung, welche sich in einem Rückstand von kognitiven, sprachlichen und sozialen Fähigkeiten äußert. Auch wenn bei über der Hälfte der registrierten Fälle die Krankheitsursachen bisher unbekannt sind, konnten neuronale Migrationsdefekte als Basis für die Entstehung bestimmter Syndrome identifiziert werden. So wurden zum Beispiel im Rahmen genetischer Analysen mental retardierter Patienten mit Gehirnfehlbildungen Mutationen in den Genen *LIS1* und *Doublecortin/DCX* als Ursache für kortikale Migrationsdefekte analysiert (Reiner *et al.*, 1993; Gleeson *et al.*, 1998). Patienten mit einer als „klassische Lissenzephalie" bezeichneten Krankheit besitzen eine glatte Gehirnoberfläche ohne Einfurchungen und weisen u.a. anstelle von sechs kortikalen Schichten nur vier auf (Ozmen *et al.*, 2000). Sowohl Lis1 als auch DCX gehören zur Gruppe der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs), welche die Strukturen der Mikrotubuli in Abhängigkeit ihres Phosphorylierungsstatus stabilisieren können (Sapir *et al.*, 1997; Horesh *et al.*, 1999). Die Stabilisierung von Mikrotubuli spielt während der neuronalen Migration sowohl beim Auswachsen des „leading neurite" als auch bei der Translokation des Zellkerns eine wichtige Rolle. Daher können Defekte in den MAPs oder auch in Aktin-assoziierten Proteinen die Beweglichkeit migrierender Neuronen erheblich einschränken und die Entwicklung des Nervensystems stören.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Protein MEGAP analysiert, das vor einigen Jahren bei einer Patientin mit starker mentaler Retardierung als Kandidatengen für neuronale Entwicklungsdefekte isoliert werden konnte (Endris *et al.*, 2002).

1.2 MEGAP ist Mitglied der Slit-Robo-GAP (srGAP) Familie

Aufgrund des Zusammenhangs zwischen der Proteinfunktion von MEGAP und mentaler Retardierung erfolgte die Bezeichnung „**ME**ntal disorder-associated **GAP** protein". Wie der Name bereits impliziert, gehört MEGAP zur Gruppe der GTPase-aktivierenden Proteine (GAPs) und durch seine Interaktion mit dem Transmembranrezeptor Robo1 speziell zur Proteinfamilie der Slit-Robo GAPs (srGAPs). Die srGAPs wurden zunächst im Rahmen der Suche nach Interaktionspartnern für den Drosophila „Roundabout" Rezeptor Robo identifiziert. Die Proteinfamilie setzt sich aus den Proteinen srGAP1, srGAP2 und

srGAP3/MEGAP zusammen. Sie besitzen eine Proteinstruktur mit hoch konservierten Domänen, welche eine N-terminale FCH-Domäne („Fes/CIP4 homology domain“), eine zentrale RhoGAP-Domäne und eine SH3-Domäne („Src homology 3 domain“) beinhaltet (Wong *et al.*, 2001); (Abbildung 9). Die Prolin-reiche zytoplasmatische CC3-Domäne der Robo-Rezeptoren bindet direkt an die SH3-Domäne der srGAP-Familie. Das Motiv der SH3-Domäne ist weit verbreitet und stellt ein wichtiges Modul für Protein-Protein Interaktionen und damit verbundene Signalkaskaden dar (Mayer, 2001). Neben der Bindung an die CC3-Domäne von Robo1 interagiert MEGAP über die SH3-Domäne auch mit dem WAVE-1 Komplex (Soderling *et al.*, 2002).

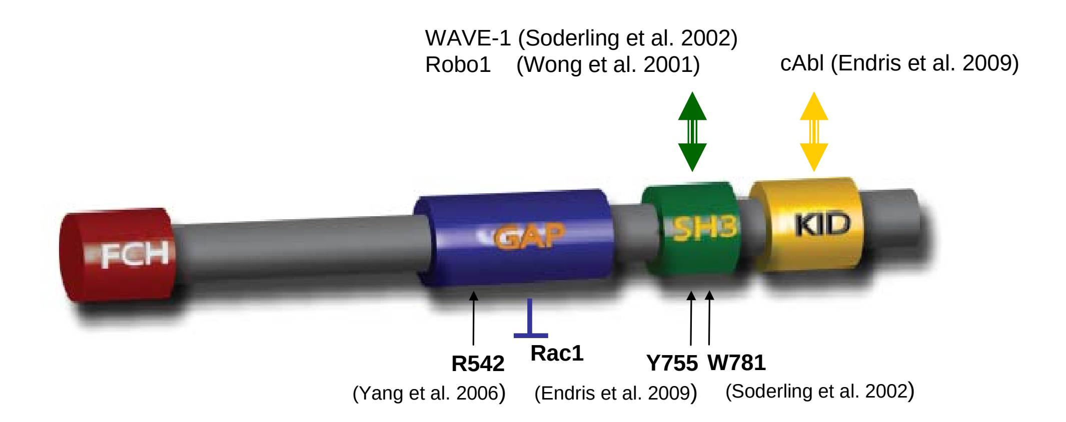


Abbildung 9: Domänenstruktur des MEGAP Proteins. Über die GAP-Domäne inaktiviert MEGAP spezifisch Rac1 und auch Cdc42 (nicht im Schema gezeigt). Die MEGAP-SH3 Domäne spielt eine wichtige Rolle bei Protein-Protein Interaktionen wie z.B. der Interaktion zwischen MEGAP und dem WAVE-1 Komplex oder Robo1. Sowohl für die GAP- als auch die SH3-Domäne wurden funktionell essentielle Aminosäurereste identifiziert.

Die GAP-Aktivität der srGAPs scheint jeweils spezifisch für bestimmte Rho-GTPasen zu sein. So reguliert srGAP1 hauptsächlich die Aktivität von Cdc42, wohingegen MEGAP maßgeblich die Aktivität von Rac1 inhibiert (Endris *et al.*, 2002; Soderling *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu wurde die Spezifität von srGAP2 bisher noch nicht ermittelt.

1.3 MEGAP ist in Signaltransduktionskaskaden an der Zellmembran eingebunden

1.3.1 MEGAP inhibiert die Polymerisation von verzweigtem Aktin

Die Proteinfamilie der kleinen Rho-GTPasen nimmt eine zentrale Rolle in den Signaltransduktionskaskaden ein, welche die Organisation des Zytoskeletts regulieren. Wie

bereits beschrieben, ist die Formation eines stark verzweigten Aktin-Netzwerkes essentiell für das Auswachsen von Lamellipodien. Dieser Prozess wird über den Arp2/3 Komplex vermittelt, dessen Aktivierung durch den WAVE Komplex erfolgt (Machesky *et al.*, 1999; Rohatgi *et al.*, 1999). Der WAVE Komplex wurde zusammen mit WAVE-1 aus Rindergehirn isoliert und setzt sich neben WAVE-1 aus den Proteinen Abi (Abl-interacting protein), Nap1 (Nck-associated protein), HSPC300 sowie PIR121/Sra1 zusammen (Eden *et al.*, 2002). Die Bindung von aktiviertem WAVE induziert eine Konformationsänderung im Arp2/3 Komplex, so dass dieser als Keim für die Anlagerung von Aktin-Monomeren an ein bereits existierendes Aktinfilament fungieren kann (Volkmann *et al.*, 2001; Rodal *et al.*, 2005). Initiiert wird diese Signalkaskade über die kleine Rho-GTPase Rac1, welche im aktivierten Zustand an PIR121 des WAVE Komplexes bindet. Es existieren zwei kontroverse Modelle, welche die Aktivierung des WAVE Komplexes durch Rac1 beschreiben (Blagg and Insall, 2004). Die Aktivierung von Rac1 erfolgt durch die Bindung von GTP im Rahmen des so genannten Rho-Zyklus, den alle kleinen Rho-GTPasen durchlaufen (Abbildung 10).

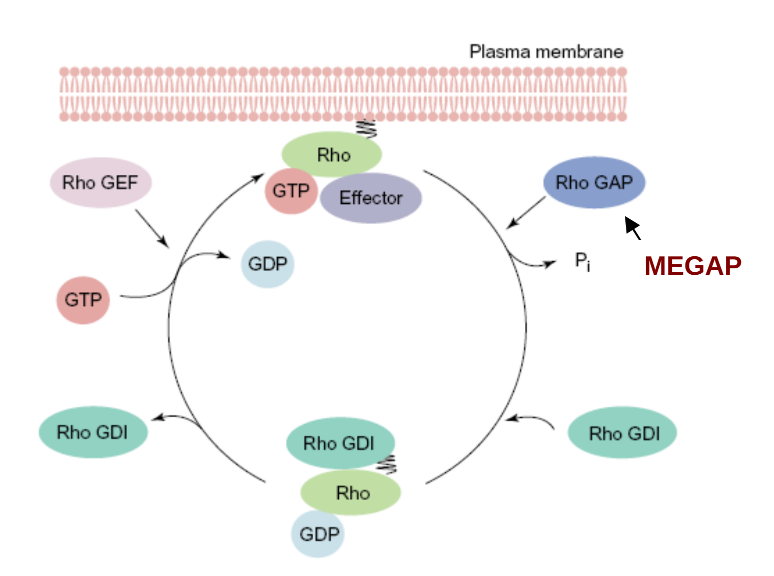


Abbildung 10: Der Rho-Zyklus der kleinen GTPasen. In ruhendem Zustand existieren die Rho-Proteine hauptsächlich in ihrer inaktiven, GDP-gebundenen Form und in Komplexen mit Rho-GDIs („guanine nucleotide dissociation inhibitors“). Nach der Stimulierung durch extrazelluläre Signale dissoziiert Rho-GDP von Rho-GDI und lokalisiert an spezifische Positionen der Zellmembran. Hier wird mittels aktivierter Rho-GEFs („guanine nucleotide exchange factors“) GDP durch GTP ausgetauscht. Aktivierte, GTP-gebundene, Rho-Proteine interagieren anschließend mit ihren Effektoren wie zum Beispiel Rac1 mit WAVE-1. Die GAP-Proteine können die niedrige intrinsische GTPase-Aktivität der Rho-GTPasen stimulieren, so dass vermehrt inaktives Rho-GDP gebildet wird. Über diesen Weg erfolgt die Hemmung assoziierter Signalwege durch die Rho-GAPs. Modifiziert nach Watanabe *et al.*, 2005.

Die Arbeiten von Endris et al. und Soderling et al. haben dargelegt, dass MEGAP mit seiner GTPase-aktivierenden Funktion spezifisch die Aktivität von Rac1 und Cdc42 inhibiert. Somit ist MEGAP über die Funktion seiner GAP-Domäne direkt in die negative Regulation der Aktin-Dynamiken eingebunden. Eine weitere Verbindung zwischen MEGAP und dem Aktinzytoskelett besteht in der Interaktion zwischen der MEGAP-SH3 Domäne und WAVE-1. Durch die Integration in den WAVE Komplex kann MEGAP gezielt die Aktivität von Rac1 hemmen und folglich auch die Aktivierung von WAVE-1 und Arp2/3 unterbinden (Abbildung 11).

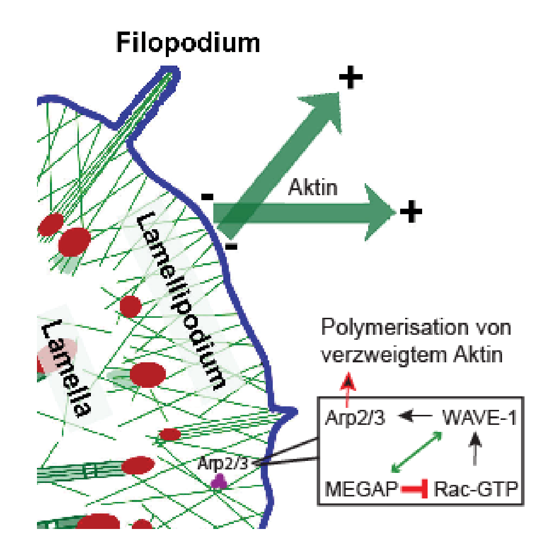


Abbildung 11: MEGAP und die Regulation des Aktinzytoskeletts. Über die Inhibierung von Rac1 und die Interaktion mit dem WAVE-1 Komplex hemmt MEGAP die Polymerisation von verzweigtem Aktin. Modifiziert nach „A Video Tour of Cell Motility“.

1.3.2 Signaltransduktion über den Slit/Robo-Komplex im Wachstumskegel

Eine wichtige Gemeinsamkeit der srGAPs ist die Interaktion der SH3-Domäne mit der CC3-Domäne der Robo-Rezeptoren (Wong *et al.*, 2001) und somit die Einbindung in die Slit-Robo vermittelte Signaltransduktion (Brose *et al.*, 1999). Die Robo-Rezeptoren werden u.a. im Wachstumskegel exprimiert und sind an der repulsiven Wegfindung von neuronalen Vorläuferzellen und auswachsenden Axonen beteiligt. Der Prozess der „Abstoßung“ von Robo1-exprimierenden Wachstumskegeln durch die Bindung des repulsiven Liganden Slit ist zum Beispiel nach dem Überqueren der Mittellinie des ZNS erforderlich, damit die Axone kommissuraler Neuronen die Mittellinie nicht ein zweites Mal kreuzen. Über dieses Migrationsereignis werden die beiden symmetrischen Hälften des ZNS miteinander verknüpft

(Dickson, 2002; Dickson and Gilestro, 2006). Allerdings ist die Slit-Robo Signaltransduktion nicht auf das Nervensystem beschränkt. In Vertebraten spielt sie zusätzlich wichtige Rollen bei der Entwicklung zum Beispiel von Lunge und Niere. Des Weiteren sind die Slit/Robo-Komplexe in pathologische Prozesse wie Krebs involviert (Hinck, 2004; Chedotal *et al.*, 2005).

Wie die Bindung von Slit an den Robo-Rezeptor intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, ist bisher noch nicht verstanden. Es wird angenommen, dass mehrere katalytisch inaktive Adaptorproteine an die zytoplasmatische Domäne von Robo gebunden sind und dass die Bindung von Slit diese Interaktionen reguliert (Hohenester, 2008). Die Assoziation der srGAPs mit Robo zeigt auf, dass nach der Aktivierung des Rezeptors durch Slit eine Umstrukturierung des Zytoskeletts über die Regulation der kleinen Rho-GTPasen erfolgt (Wong *et al.*, 2001). Neben den srGAPs sind auch die Tyrosin-Kinase c-Abl und das Ena/VASP-Protein Ena mit zytoplasmatischen Bereichen des Robo-Rezeptors assoziiert (Bashaw *et al.*, 2000). Somit ist MEGAP eine Komponente der Signalkaskaden, welche nach der Aktivierung des Robo-Rezeptors die Struktur des Zytoskeletts beeinflussen.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass MEGAP über die Interaktion mit dem Transmembranrezeptor Robo1 in die repulsive Wegfindung von Wachstumskegeln involviert ist. Mit seiner GAP-Domäne inhibiert MEGAP spezifisch die Aktivität von Rac1 und Cdc42 und übt somit einen direkten Einfluss auf das Aktinzytoskelett aus. Zusätzlich zu seiner GTPase-aktivierenden Funktion kann MEGAP die Polymerisation von Aktin über die Bindung an den WAVE-1 Komplex hemmen. Obwohl die Signaltransduktion innerhalb dieses komplexen Netzwerkes aus Struktur- und regulatorischen Proteinen schon teilweise untersucht wurde, sind bisher noch wenig Details über die genaue Funktionsweise und Regulation von MEGAP bekannt. Um ein besseres Verständnis für die Rolle von MEGAP mit Hinblick auf die Regulation des Zytoskeletts und die damit assoziierten neuronalen Migrationsprozesse zu erhalten, sollten in dieser Arbeit bisher unbekannte Interaktionspartner von MEGAP identifiziert und die funktionelle Bedeutung der Interaktion charakterisiert werden. Davon verspricht man sich auch den Gewinn neuer Erkenntnisse, wie sich Fehlfunktionen des MEGAP-Proteins auf das Migrationsverhalten von Neuronen und Axonen und somit auch auf kognitive Funktionen auswirken können.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Pufferlösungen

PBS (10x):
80 g NaCl
2 g KCl
14.4 g Na_2HPO_4
2.4 g KH_2PO_4
pH 7.4, ad H_2O 1l

TBS (10x):
60.55 g Tris/HCl [0.5 M]
87.67 g NaCl [1.5 M]
pH 7.4, ad H_2O 1l

TE (1x):
50 mM Tris/HCl, pH 8.0
20 mM EDTA

2.2 Nährmedien für Bakterien

SOC-Medium:
20 g Bacto®-tryptone
5 g Bacto®-yeast extract
10 ml NaCl [1 M]
2.5 ml KCl [1 M]
5 ml $MgCl_2$ [2 M]
10 ml Glucose, steril-filtriert [2 M]
pH 7.0, ad H_2O 1l

LB-Medium:
10 g NaCl
10 g Bacto®-tryptone
5 g Bacto®-yeast extract
ad H_2O 1l
für Agar-Platten:+ 15 g Bacto®-Agar

IPTG/X-Gal-Platten: pro Platte 20 µl IPTG [100 mM] und 50 µl X-Gal (2 %) zugeben

Ampicillin: 50 mg/ml in Ethanol [70%]

Kanamycin: 20 mg/ml in H_2O

Chloramphenicol: 25 mg/ml in Ethanol [100%]

Gentamycin: 10 mg/ml in H_2O

2.3 Antikörper

2.3.1 Primärantikörper

Antikörper	*Klon*	*Tier*	*Typ*	*Immunogen*	*Hersteller*
MEGAP 19	19.1	Kaninchen	Monospezifische IgG-Fraktion	CHELRELERQNTVKQ	Pineda
Vinculin	hVIN-1	Maus	monoklonal IgG1	humanes Vinculin, aufgereinigt aus Uterus	SIGMA-ALDRICH
Myc-tag	9B11	Maus	monoklonal	EQKLISEEDL (humanes c-Myc AS 410-419)	Cell signaling Technology
Lpd	-	Kaninchen	polyklonal	Lpd-GST-FP4-2 (AS 888–1060) nach Verdau mit PreScission Protease	Covance, (Krause et al., 2004)
Anti-Digoxigenin-AP	-	Schaf	polyklonal, Fab fragments	Digoxigenin	Roche Applied Science

2.3.2 Sekundärantikörper

Antikörper	*Konjugat*	*Tier*	*Firma*	*Katalog-Nr*
Anti-Maus	Peroxidase	Ziege	SIGMA	A 4416
Anti-Maus	Alexa Fluor 546	Ziege	Molecular Probes	A 11003
Anti-Maus	Alexa Fluor 488	Esel	Molecular Probes	A 21202
Anti-Maus	IRDye 680	Esel	LI-COR	926-32222
Anti-Maus	IRDye 800CW	Esel	LI-COR	926-32212
Anti-Kaninchen	Peroxidase	Ziege	SIGMA	A 6154
Anti-Kaninchen	Alexa Fluor 555	Esel	Molecular Probes	A 31572
Anti-Kaninchen	Alexa Fluor 488	Esel	Molecular Probes	A 21206
Anti-Kaninchen	IRDye 680	Esel	LI-COR	926-32223
Anti-Kaninchen	IRDye 800CW	Esel	LI-COR	926-32213

2.4 Primer

Bezeichnung	***Sequenz (5'-3')***
CMV for	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
BGH rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG
M13 for	ACGTTGTAAAACGACGGCCAG
M13 rev	GGAAACAGCTATGACCATG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG
pENTRY-for sequence	ACTTAAGCTCGGGCCCCAAATAA
pENTRY-rev sequence	GAGATTTTGAGACACGGGCCAGA
Dest32 for	AACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTG
Dest32 rev	AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC
pEXP-AD22 for	TATAACGCGTTTGGAATCACT
AD502 for	CGGTCCGAACCTCATAACAACTC
AD502 rev	GTAAATTTCTGGCAAGGTAGACAAGCCGA

Tabelle 1: Vektorprimer

Bezeichnung	***Sequenz (5'-3')***
MEGAP2288for-EcoRI	ATGGGGAATTCCGTTGACCATGACAATGGCACTG
MEGAP-2504for-EcoRI	GATGGGAATTCCCAGGACATGGATGATGCCTTC
MEGAP3010rev-XhoI	CTAGATACTCGAGGTGCTCATGGTCTTCTCGATG
RG-Exon21rev	TCTCAGGGCTCTCGATCCT
RG-Ex9 for	GCCACCATGCAGACATTACA
RG-Ex14 rev	ACTCTGAAGATCCCCTGCTG

Tabelle 2: MEGAP-spezifische Primer

Bezeichnung	***Sequenz (5'-3')***
hLPD -Start-SalI for	GCAGTCGACATGGAGCAGCTATCAGATGAA
hLPD - 468 rev	AGGCATCCAGATCCACAGTC
hLpd-800for-EcoRI	ATCGAATTCAGGCACAGTGAGTGATGCTG
hLpd-1335for-EcoRI	GCAGAATTCCGAAACAGCTGAGATGGCAGA
hLpd-1857rev-SalI*	GTTGTCGACTCACTCTGGGATGCTGGAAGAA
hLpd_939for_BamH1	AGAGGATCCAGGGCAGCCAATTACTGAGG
hLpd_946for_BamH1	GGTGGATCCCCAATTACTGAGGAAGAACA
hLpd_1904rev_SalI	ACAGTCGACTCAGTCAGAAACTCCGCTATCAG
hLpd_1885for_BamH1	AGAGGATCCTCTGATAGCGGAGTTTCTGAC
hLpd_2607rev_SalI	ATAGTCGACTCACACAGTCTTGGTGCTGGTTG
hLpd_2587for_BamH1	ATAGGATCCCCAACCAGCACCAAGACTGT

hLpd_3534rev_SalI	ATAGTCGACTCAGACTGCCACTTTTGGAGAGG
hLpd_3515for_BamH1	ATAGGATCCACCTCTCCAAAAGTGGCAGTC
hLpd_4069rev_SalI	ATAGTCGACAGGAGGCTCTGAACACCTGA
pBSIILpd_-60for_SacII	ATACCGCGGCGCGCGTAATACGACTCAC
hLpd_3975rev_NheI	ATAGCTAGCCCAGTCTCTGGAGAGCTTGG
mLpd_Ex1_267_for	GGACCTGGATAAAATGTTTGGG
mLpd_Ex2_381_rev	TGTTTCCTGGCGAAGAGGAG
mLpd_Ex11_1731_for	GAACAAATACAAAGCACCCACAG
mLpd_Ex12_1830_rev	TGCATCATCACAGCAAAGGT
mLpd_827_rev	CGGGAGGAGTTACTGATGGA
mLpd_1092_for	GCTGGATAACCTGATGGACAA

Tabelle 3: Lpd-spezifische Primer

Bezeichnung	***Sequenz (5'-3')***
mDia1_1035_for	TCCAGCTGAGGAACTGGACT
mDia1_1505_rev	TTGGCCTCAGATTTTTCCAC

Tabelle 4: mDia1-spezifische Primer

Bezeichnung	***Sequenz (5'-3')***
mRobo1-4071for	TCCCCACCTCATACTTACGG
mRobo1-4555rev	GATCATCTGCGTAGGCTTCC

Tabelle 5: Robo1-spezifische Primer

Bezeichnung	***Sequenz (5'-3')***
mCherry_for_DraI_ClaI	ATATTTAAAATCGATATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
mCherry_rev_SalI	ATAGTCGACCTTGTACAGCTCGTCCATGC
EGFP-N Sequencing	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG
EGFP-C Sequencing	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
Periphilin1_627_for	TCCTGGTGCCTCCTACAAAC
Periphilin1_827_rev	TAGCTTTTCAGCAGCCCACT
Periphilin1_1031var1-4_for	GTGAAACTTTCGGGATGGTG
Periphilin1_1372var1_rev	TCCTCTCAGCCTCCTGAGTT
Periphilin1_1200var2-4_rev	TGCTTGAGTTCTTCAACACACC
CAT53_1706_for	CTAACCAACTGACCCGGAAA
CAT53_1884_rev	CTCAAATGCATGTCGGTCTG
hFAK-2176 rev	AGGACAATTTGGAGGCATTG
GAPDH for	ACCACAGTCCATGCCATCAC
GAPDH rev	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

Tabelle 6: sonstige Primer

2.5 DNA-Sequenzierung

Im Anschluss an PCR-Reaktionen (Saiki et al., 1985) wurden die Sequenzen der generierten Produkte bei Bedarf mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sequenzierungen basieren auf dem Prinzip der Kettenabbruch-Reaktion durch Didesoxynukleotid-Zugabe (Sanger et al., 1977).

Kits und Reagenzien zur DNA-Sequenzierung

DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences)	Premix mit fluoreszenzmarkierten Didesoxy-nukleotiden für die Sequenzierreaktion
CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase; MBI-Fermentas)	1 U/µl
ExoI (Exonuklease I; MBI-Fermentas)	20 U/µl
Sephadex-G50 fine (GE Healthcare)	
GFX^{TM} TempliPhi (GE Healthcare)	

2.5.1 Sequenzierung von PCR-Produkten

Aufreinigung von PCR-Produkten mittels Exo/CIAP

Zum Entfernen von Primern und überschüssigen Nukleotiden mussten zunächst die PCR-Produkte mittels Exo I und CIAP aufgereinigt werden. Während ExoI den Abbau von Nukleotiden einzelsträngiger DNA (von 3’ nach 5’) katalysiert, entfernt die Phosphatase die 5’-Phosphatreste der DNA-Moleküle. Die Reaktion erfolgte bei 37°C für 15 min, anschließend wurden die Enzyme bei 85°C für 15 min inaktiviert.

Ansatz:

PCR-Produkt:	2.5µl
ExoI [20U/µl]:	0.25µl
CIAP [1U/µl]:	0.5µl
H_2O:	0.75 µl

Sequenzierreaktion

Sequenzier-PCR:

PCR-Produkt (Exo/CIAP):	2 µl
Primer [10 pmol/µl]:	0.5 µl
Premix:	2 µl
H_2O:	0.5 µl

Standard-Programm:

20 sec	94°C	
2 min	60°C	30 Zyklen

Falls die verwendeten Primer eine von 60°C abweichende Annealing-Temperatur aufwiesen, wurde ein zusätzlicher Temperaturschritt in die Sequenzier-PCR eingefügt:

20 sec	94°C
20 sec	T_A
2 min	60°C

Nach Beendigung der Sequenzreaktion wurden die Proben mit je 15 µl H_2O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt.

Die Aufreinigung der Sequenzreaktion erfolgte mit Hilfe von Sephadex-G50 in Millipore Multiscreen-HV-Platten. Dabei werden nicht eingebaute Didesoxynukleotide, überschüssige Primer und Polymerase von den eigentlichen Sequenzierprodukten abgetrennt:

- Befüllen einer 96-Well-Multiscreen-HV-Platte mit Sephadex-G50-Pulver.
- Zugabe von je 300 µl H_2O bidest. pro Well, Inkubation bei RT für mind. 3 h, um das Sephadex gut quellen zu lassen.
- Abzentrifugieren der Flüssigkeit bei 910 x g für 5 min, wobei die austretende Flüssigkeit von einer herkömmlichen 96-Well-Platte aufgefangen wird.
- Erneute Zugabe von 150 µl H_2O bidest. pro Well, kurz quellen lassen, Abzentrifugieren der Flüssigkeit bei 910 x g für 5 min.
- Beladen der so vorbehandelten MultiScreen-Platte mit der Sequenzreaktion. Zentrifugation bei 910 x g für 5 min, wobei das entstehende Eluat (aufgereinigte Sequenzierreaktion) in einer frischen 96-Well-Platte aufgefangen wird.

Die technische Bedienung des MegaBACE1000-Sequenziergerätes erfolgte nach den Herstellerangaben. Die Sequenzierungen wurden standardmäßig unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Injektion der Proben: 3.5 kV für 30s

Lauf: 9 kV für 100-150 min je nach Länge der Fragmente, Temperatur 44°C

Puffer: 1x LPA-Puffer (Amersham)

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des MegaBACE Sequence Analyzer Programms (Amersham Biosciences 2002) ausgewertet.

2.5.2 TempliPhi Amplifikation von Plasmidklonen

Plasmidkonstrukte wurden ebenfalls auf dem MegaBACE1000 Sequenziergerät sequenziert, allerdings wurden die Plasmide zunächst mit Hilfe der TempliPhi Reaktion (Amersham Biosciences) amplifiziert, bevor die eigentliche Reaktion mit dem DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences) durchgeführt wurde.

Die TempliPhi Amplifizierung beruht auf dem Prinzip der *Rolling Circle* Amplifizierung der Polymerase des Bakteriophagen φ29. Als Ausgangsmaterial dient eine Übernachtkultur des Plasmid-Klons. Die resultierenden DNA-Konkatemere können direkt ohne vorherige Aufreinigung in die Sequenzierreaktion eingesetzt werden.

Durchführung:

- 1 µl Bakterien-Übernachtkultur wurden mit 2.5 µl Sample Buffer gemischt und 3 min bei 95°C in 0.2 ml PCR-Gefäßen in einem Thermocycler inkubiert, anschließend Abkühlen der Reaktion auf 4°C.
- 2.5 µl Reaktions-Puffer wurden mit 0.2 µl Phi-Polymerase gemischt und zu den Zelllysaten gegeben.
- Die Polymerisationsreaktion wurde für 16 h bei 30°C im Thermocycler durchgeführt. Anschließend wurde das Enzym durch eine 10-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert.

Vom so erhaltenen Reaktionsansatz wurden 0.5 – 1.5 µl für eine übliche Sequenzier-PCR (Abschnitt 2.5.1) eingesetzt.

2.6 Das Gateway™ Klonierungssystem

Ende der 90er Jahre wurden Methoden entwickelt, die eine Klonierung ohne die Verwendung von Restriktionsenzymen und DNA-Ligasen ermöglichten, wobei sich insbesondere das Gateway™ Klonierungssystem (Invitrogen) als zuverlässig erwiesen hat (Hartley et al., 2000). Es beruht auf der sequenzspezifischen Rekombinationsfähigkeit des Bakteriophagen Lambda, die sowohl für den Einbau seines Genoms in das Bakteriengenom als auch für den Wechsel zwischen lysogenem und lytischem Weg verantwortlich ist (Landy, 1989). Die dafür notwendigen „Clonasen“ wurden zu einem Klonierungssystem zusammengestellt, mit dem

beliebige DNA-Fragmente zunächst in Plasmide kloniert (Generierung von Entry-Vektoren) und anschließend zwischen Plasmiden transferiert werden können.
Der Vorteil liegt darin, dass die Rekombinase vier verschiedene Erkennungssequenzen (attB, attP, attL, attR) unterscheidet, wobei DNA-Fragmente nur von attB nach attP sowie von attL nach attR übertragen werden können (Tabelle 7).

	Reaktion	*katalysiert durch*
Lytischer Weg	*att*L x *att*R → *att*B x *att*P	LR Clonase (Int, Xis, IHF)
Lysogener Weg	*att*B x *att*P → *att*L x *att*R	BP Clonase (Int, IHF)

Tabelle 7: Prinzip des „Gateway“ Klonierungssystems. Der lysogene Weg wird durch die BP Clonase katalysiert, der lytische Weg durch die LR Clonase.

Diese gerichtete Umklonierung ist konservativ, so dass kein Netto-Gewinn oder Verlust an Nukleotiden erfolgt und somit das Leseraster erhalten bleibt. Tabelle 8 zeigt, welche Ausgangsprodukte für die Klonierungen eingesetzt wurden:

Ausgangsprodukte	*Erkennungssequenz*	*Resistenz*
PCR-Produkte von pEXP-AD502-Vektoren	attB	-
pDONR201	attP	Kanamycin
pDONR221	attP	Kanamycin
pENTR1A	attL	Kanamycin
pENTR2B	attL	Kanamycin
pENTR3C	attL	Kanamycin
pDEST22	attR	Ampicillin
pDEST32	attR	Gentamycin
pcDNA-DEST53	attR	Ampicillin

Tabelle 8: Ausgangsprodukte des Gateway™ Klonierungssystems. Angegeben sind auch die jeweiligen Erkennungssequenzen der Clonasen und die Resistenzen der resultierenden Endprodukte.

LR-Reaktion

Die LR-Reaktion wurde generell verwendet, um cDNA-Fragmente von einem Entry-Vektor in Gateway-Expressionsvektoren (pDEST-Vektoren) zu transferieren. Die folgenden Komponenten wurden für die LR-Reaktion (10 µl-Ansatz) in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß gemischt:

Komponente	***Probe***	***Negativkontrolle***
Entry-Vektor (150 $^{ng}/_{\mu l}$)	1 µl	--
pDEST-Vektor (150 $^{ng}/_{\mu l}$)	1 µl	1 µl
5x LR Clonase Reaktionspuffer	2 µl	2 µl
1x TE Puffer, pH 8.0	ad 9.2 µl	9.2 µl

- Zugabe von 0.8 µl LR Clonase zu jedem Reaktionsansatz; Inkubation für 1 h bei 25°C (bei sehr großen Plasmiden auch länger)
- Zugabe von 1 µl ProteinaseK zu jedem Reaktionsansatz, 10 min Inkubation bei 37°C
- Einsatz von je 1-2 µl jedes Reaktionsansatzes für die Transformation in Bakterien

BP-Reaktion

Neben der LR-Reaktion wurde die BP-Reaktion eingesetzt, um cDNA-Fragmente aus pDEST-Vektoren in pDONR-Vektoren zu transferieren. Diese Generierung von ENTRY-Vektoren aus Gateway-Expressionsvektoren war u. a. für den "Library Swap" (Abschnitt 3.2.1.1) erforderlich. Hierbei wurde unter Verwendung einer BP Clonase und entsprechendem 5x BP Clonase Reaktionspuffer analog zur LR-Reaktion vorgegangen (siehe oben).

2.7 Analyse von Protein-Protein Interaktionen

2.7.1 Herstellung von Zelllysaten

Lysis-Puffer (modifizierter Ripa-Puffer, Zusammensetzung nach Upstate):

50 mM Tris/HCl pH 7.4
1 % NP-40 (Igepal)
0.25 % Natriumdeoxycholat
1 mM EDTA
150 mM NaCl
1x Protease Inhibitor Cocktail (SERVA) *
2 mM Na_3VO_4 (aktiviert) *
2 mM NaF *
(* - direkt vor der Benutzung des Puffers frisch zugeben)

Die Herstellung von Proteinextrakten aus transient transfizierten Zellen oder aus Geweben erfolgte in Vorbereitung für GST-Pulldown oder Co-Immunpräzipitation (Co-IP), (Abschnitt 2.7.3). Standardmäßig wurden für die Pulldown- und Co-IP-Studien transfizierte HEK293 Zellen, ausgesät auf ∅10 cm Gewebekulturschalen, benutzt. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und anschließend auf Eis im Kühlraum in 2x 350 µl Lysis-

Puffer mit einem Zellschaber abgelöst. Das Zelllysat wurde nach 5-minütiger Inkubation auf Eis für 15 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und der erhaltene Überstand in ein frisches 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Lysaten.

2.7.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Quantifizierung von Proteinkonzentrationen in Zell- oder Gewebeextrakten wurde mit dem BCA Protein Assay Kit (PIERCE) durchgeführt. Bei der BCA-Reaktion (BCA - Bicinchoninsäure) reagieren zweiwertige Kupferionen quantitativ mit Protein zu einwertigen Kupferionen. Diese geben mit BCA einen violetten Farbstoff, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch ausgewertet werden kann. Das Protokoll wurde laut Angaben des Herstellers durchgeführt und an den Maßstab einer 96-Well-Platte angepasst.

2.7.3 GST-Pulldown und Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Die Pulldown- und Co-IP-Studien wurden mit Proteinextrakten (Abschnitt 2.7.1) aus Geweben (Maus-Gehirn) oder aus transient transfizierten Zellen (HEK293) durchgeführt.

Für die Pulldown-Experimente wurden GST-Fusionsproteine mit der aufgereinigten MEGAP-SH3 Domäne (Abschnitt 2.8.1) und dem entsprechenden Zelllysat (Proteinmenge ca. 1000 µg) gemischt und über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfrotator inkubiert. Am nächsten Tag wurden die GST-MEGAP-SH3 / Proteinkomplexe für 5 min bei 3500 rpm abzentrifugiert. Ungebundene Proteine wurden durch das wiederholte Waschen mit Lysis-Puffer entfernt (3x 500 µl). Abschließend wurde der Pufferüberstand bis auf ca. 20 µl abgenommen, die Proben mit 5x SDS-Sample Buffer versetzt und mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Die Identifizierung von Proteinen, welche zusammen mit der GST-MEGAP-SH3 Domäne präzipitiert wurden, erfolgte (nach einem Trypsinverdau) mit Hilfe eines ESI-QUAD-TOF Massenspektrometers. Die so erhaltenen Ionenmassen der generierten Proteinfragmente wurden mit dem Mascot Programm analysiert und mit Proteinsequenzen aus der „NCBInr protein database“ verglichen

Zusätzlich zu den GST-Pulldown Experimenten wurde die Co-IP eingesetzt, um Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* nachzuweisen. Für einen Co-IP-Ansatz wurden 750 - 1000 µg Protein in einem maximalen Volumen von 1 ml verwendet. Anschließend wurden 1 - 2 µg

Antikörper zugegeben und 1 – 2 h auf Eis inkubiert. Die Antigen / Antikörper Komplexe wurden anschließend durch Zugabe von 8 µl gewaschenen Protein A/G Sepharose Beads (Ultralink Protein A/G Sepharose; PIERCE) über Nacht gebunden. Die Beads wurden am nächsten Tag mit 3500 rpm für 5 min abzentrifugiert und insgesamt dreimal mit 800 µl Lysis-Puffer gewaschen. Analog zum GST-Pulldown erfolgte die weitere Analyse durch SDS-PAGE und Western Blot.

2.7.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) und Western Blot

Verwendete Puffer und Materialien

Proteinmarker: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)

5x SDS-Sample Buffer:
0.225 M Tris / HCl pH 6.8
50% Glycerol
5% SDS
0.05% Bromphenolblau
0.25 M DTT

Laemmli-Puffer (10x):
0.25 M Tris
1.92 M Glycin
1% SDS

Transfer-Puffer (10x):
0.25 M Tris
1.92 M Glycin

Gel-, Blottingapparatur: Novex XCell *SureLock*™ Mini-Cell

Coomassie Blue: 0.25 g Coomassie Brilliant Blue in 100 ml Destain-Lösung

Destain-Lösung:
30% (v/v) Methanol
10% (v/v) Eisessig

Blocking-Lösung I: 3% Milchpuver in 1x TBS, 0.1% Tween

Blocking-Lösung II: 50% Odyssey Blocking Buffer (LI-COR) in 1x TBS

ECL-Lösung:

Luminol:
200 ml 0.1 M Tris / HCl pH 8.6
62 µl H_2O_2
50 mg Luminol

Enhancer: 11 mg p-Hydroxycoumaric acid (Sigma C9008) in 10 ml DMSO
8 ml Lösung mit 2 ml H_2O kurz vor Gebrauch mischen. Zugabe von 20 - 30 µl Enhancer Lösung.

PVDF-Membran: Hybond-P, GE Healthcare (Chemilumineszenz-Detektion)
Immobilon-FL, Millipore (Proteindetektion und Quantifizierung mit dem LI-COR Imager)

SDS-PAGE

- Proben mit 3 - 4 µl 5x SDS Sample Buffer mischen
- aufkochen bei 95°C für 3 min
- SDS-Page nach Protokoll (Sambrook and Maniatis: ‚Molecular Cloning') herstellen
- Proben auf SDS-Page auftragen. Elektrophorese bei 125 - 150 V für 1.5 h
- Coomassie Blue Färbung 30 min bei RT schütteln, danach Ü.N. mit Destain-Lösung entfärben

Western Blot

- PVDF-Membran auf das ungefärbte Gel legen, beidseits mit Whatman 3M Papier, getränkt in 1x Transfer-Puffer, versehen
- Gel-PVDF Sandwich zwischen Blottingpads legen und in XCell Blottingapparatur legen. Blotten mit 125 mA für 1.5 h

Chemilumineszenz-Detektion

- Geblottete Membran für 1 h in Blocking Lösung I blocken
- Primären Antikörper in Blocking-Lösung I verdünnen (1:40 - 1:5000 je nach Antikörper)
- Ü.N. bei 4°C inkubieren
- 3 - 5x waschen mit 1x TBS, 0.1% Tween. Antikörper-Lösung kann mehrfach wiederverwendet werden
- Inkubation mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper, 1:10000 verdünnt in Blocking-Lösung I für 1 h bei RT
- 3 - 5x waschen mit 1x TBS, 0.1% Tween
- Inkubation für 1 min bei RT in ECL-Lösung
- kurzes Abwaschen mit H_2O. Sofortige Exposition auf Röntgenfilm

Proteindetektion mit dem LI-COR Imager (Odyssey® Infrared Imaging System)

Mit Hilfe des LI-COR Imagers können an eine Membran gebundene Proteine nicht nur qualitativ analysiert sondern auch quantifiziert werden. Die Behandlung der geblotteten Membran (Immobilon-FL) erfolgte analog zur Chemilumineszenz-Detektion. Allerdings wurde die Membran mit einem von LI-COR entwickelten Blocking Buffer (siehe Blocking Lösung II) unter Ausschluss von Tween geblockt. Sowohl der primäre als auch sekundäre Antikörper wurden in Blocking Lösung II, 0.1% Tween verdünnt. Anstelle des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers wurden in diesem Fall Sekundärantikörper verwendet, welche mit speziell von LI-COR entwickelten Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert waren (IRDye 680 and 800CW). Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:15000 – 1:20000) wurde die Membran mehrfach in 1x TBS, 0.1% Tween gewaschen, in 1x TBS überführt und abschließend mit dem LI-COR Imager eingescannt.

2.8 Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen in Bakterien

2.8.1 Expression

Für die Expression der GST-Fusionsproteine (Glutathion-S-Transferase) wurde das pGEX Vektorsystem verwendet. Die GST Konstrukte wurden vor der Expression in den *E.coli* Stamm BL21(DE3) transformiert. Das pGEX Vektorsystem erlaubt eine kontrollierte Proteinexpression mit Hilfe des Lac-Repressor Systems. Die Expression wird durch Bindung des Lac-Repressor, kodiert vom *lacI* Gen, an das Lac-Operon verhindert. Durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG), das den Lac-Repressor bindet und ihn inaktiviert, wird die Expression gestartet. Der Stamm BL21(DE3) trägt die $lacI^q$ Mutation und produziert genug Lac Repressor für einen effizienten Transkriptions-Block.

Die Expressionsklone wurden über Nacht in 25 ml LB-Medium plus entsprechendes Antibiotikum angeimpft und bei 37°C inkubiert. Ausgehend von dieser Starterkultur wurden am nächsten Tag ca. 200 ml LB-Medium (+Antibiotika) mit einer OD_{600} von 0.1 angeimpft. Die Kulturen wurden anschließend bei 30 - 37°C und 200 rpm im Schüttler weiter inkubiert. Die Expression der Fusionsproteine wurde durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM nach Erreichen einer Optischen Dichte von OD_{600} = 0.5 induziert. Die Zellen wurden für ca. 4 Stunden bei 37°C weiter inkubiert. Danach wurde die Kultur in 50 ml Zentrifugen-Röhrchen umgefüllt und bei 3500x g für 15 min abzentrifugiert.

Der Überstand wurde anschließend verworfen und die Zellpellets, die das rekombinante Protein enthalten, bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

2.8.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Verwendete Puffer und Materialien

NETN:	20 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 1 mM EDTA 0.5 % Nonidet P40 pH 8.0

Glutathione-Sepharose 4B: Amersham Biosciences

Protease Inhibitor Cocktail (-EDTA): Roche

Aufreinigung schwer löslicher Fusionsproteine

Modifiziert nach Frangioni et al. (Frangioni and Neel, 1993)

- Zellpellet auf Eis auftauen
- Zellen vollständig in 1 ml NETN (+ Protease Inhibitor Cocktail) resuspendieren
- Zugabe von 2 µl Lysozym [50 mg/ml]. Inkubation für 15 min auf Eis
- Zugabe von 20 µl DTT [0.5 M] und 140 µl Sarcosyl [10 %]
- Ultraschall-Behandlung für 4x 15 sec auf Eis. Die Zellen jeweils 1 min nach jedem Schritt auf Eis abkühlen lassen
- Zelllysat in 1.5 ml Reaktionsgefäße umfüllen
- Zentrifugation bei 13000 rpm für 15 min bei 4°C
- Zellüberstand in 2 ml Reaktionsgefäß überführen. Zugabe von 400 µl Triton X-100 [10%]. Mit NETN auf 2 ml auffüllen
- Inkubation für 30 min bei RT
- In der Zwischenzeit für jede Probe 80 - 100µl Glutathion-Sepharose mit NETN Puffer zwei bis dreimal waschen. Die Sepharose Beads dabei maximal bei 2000x g abzentrifugieren
- Zellüberstand mit den gewaschenen Beads mischen und für mindestens 2 Stunden bei 4°C in einem Überkopfrotator inkubieren
- Beads abzentrifugieren und dreimal mit NETN-Puffer waschen

- Proteine bei -20°C für kurzen Zeitraum oder in Aliquots bei -80°C (optional mit 10% Glycerol) lagern

2.9 RNA *in situ* Hybridisierung

2.9.1 Allgemeine Grundlagen

Die RNA i*n situ* Hybridisierung wird verwendet um mRNA-Transkripte in Geweben oder einzelnen Zellen nachzuweisen. Die Methode basiert auf der Fähigkeit einzelsträngiger Nukleinsäuren, sich mit komplementärer Basensequenz zu einem doppelsträngigen Abschnitt zusammenzulagern. Einer der beiden Stränge kommt dabei von einer zuvor hergestellten und markierten Sonde, der andere liegt im Präparat vor und soll nachgewiesen werden. Die Markierung der einzelsträngigen RNA-Sonde erfolgt üblicherweise mit Haptenen wie Digoxigenin oder auch mit Fluoreszenzfarbstoffen. Die Experimente in dieser Arbeit wurden mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden durchgeführt. Das Digoxigenin kann mit Hilfe eines Antikörpers, der beispielsweise mit einem Enzym gekoppelt ist, erkannt werden. Das Enzym, meistens Alkalische Phosphatase oder Peroxidase, kann dann durch Zusatz von Reagenzien einen Farbstoff umsetzen, der kovalent im Gewebe gebunden bleibt und sich daher nicht durch Diffusion verteilt. Beim Nachweis von mRNA in Geweben werden nur jene Zellen angefärbt (hybridisiert), in denen ein zu untersuchendes Gen aktiv ist: Nur hier liegt die entsprechende mRNA vor.

In Vorbereitung auf die Hybridisierung der Sonde wird das zu färbende Gewebe mit Hilfe von formaldehydhaltigen Lösungen fixiert und anschließend entwässert. Es besteht die Möglichkeit sowohl ganze Gewebestücke bzw. Embryonen mit der Sonde zu hybridisieren oder die mRNA auf Gewebe-Dünnschnitten nachzuweisen. In dieser Arbeit wurden Maus-Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien nach der Fixierung und Einbettung mit Hilfe eines Kryotoms (Cryostat, CM3050 S, Leica) auf eine Schichtdicke von 14 µm geschnitten und anschließend mit der Sonde hybridisiert.

2.9.2 Embryonenpräparation

- Töten des Muttertieres, Einschneiden von Bauchfell und Bauchdecke
- nach Entnahme der Embryonen Entfernung von Uterus, Fruchtblase und Plazenta

- Fixierung der Embryonen mit 4% PFA in 1x PBS Ü.N. oder länger (bei älteren Entwicklungsstadien), unter leichtem Schütteln bei 4°C
- am nächsten Tag 3x 10 min mit 1x PBS waschen
- anschließend Entwässern mit 30% Sucrose in 1x PBS Ü.N., unter leichtem Schütteln bei 4°C.
- nach Absinken auf den Boden des Gefäßes Entnahme der Embryonen aus der Sucrose-Lösung, sorgfältiges Entfernen restlicher Flüssigkeit
- unter Kühlung mit Hilfe eines Ethanol/Trockeneis-Gemisches luftblasenfreie Einbettung der Embryonen in Jung Einbettmedium (Leica Microsystems Nussloch, Katalog-Nr.: 020108926; Verwendung von Tissue Embedding Molds, Polysciences Inc., Katalog-Nr.: 18646A)
- Lagerung der eingebetteten Embryonen bei -80°C
- Herstellung von Dünnschnitten mit Hilfe eines Kryotoms, Aufnahme der Schnitte auf SuperFrost Plus Objektträger (Langenbrinck, Katalog-Nr.: 03-0060)
- Schnitte mindestens 2-3 h auf einer Heizplatte (37°C) trocknen, auf Objektträgern bei -80°C lagern

2.9.3 RNA-Sondensynthese

Die RNA-Sonden für die *In-situ*-Hybridisierung wurden mit dem Sp6/T7 MaxiScript Kit (Ambion, Katalog-Nr.: 1320) und mit dem DIG RNA labeling Mix (Roche, Katalog-Nr.: 11277073910) generiert. Um eine möglichst hohe Spezifität der RNA-Sonde zu erreichen, wurden nicht-homologe Sequenzbereiche (ca. 500 – 600 bp) eines Gens ausgewählt. Dieser Bereich wurde mittels PCR (Saiki et al., 1985) aus Maus-cDNA amplifiziert und mit dem Acceptor/Vector-Kit (Novagen) in den pSTBlue-1 Vektor kloniert. Vor der eigentlichen Synthese der Sonde in Antisense oder Sense Richtung, musste der Vektor jeweils am 5'- bzw. am 3'-Ende des klonierten cDNA-Fragments mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert werden. Hierzu wurden 5 µg des Vektors in einem 50 µl Ansatz verdaut. Die Aufreinigung des linearisierten Vektors erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit laut Angaben des Herstellers. Für die Sondensynthese wurde 1 µg der aufgereinigten DNA eingesetzt. Die aufgeführten Komponenten wurden für die *in-vitro*-Transkription (20 µl-Ansatz) in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß auf Eis gemischt:

Komponente	*Antisense (T7)*	*Sense (Sp6)*
DNA (linearisierter Vektor)	1 µg in mind. 5µl	1 µg in mind. 5µl
Transcription buffer	2 µl	2 µl
DIG labeling Mix	1 µl	1 µl
RNase out (Invitrogen)	0.5 µl	0.5 µl
T7 RNA Polymerase	2 µl	-
Sp6 RNA Polymerase	-	2 µl
H_2O	ad 20 µl	ad 20 µl

- Inkubation der Ansätze für 2-3 h bei 37°C
- Zugabe von 1 µl tRNA [50 mg/ml], (Roche, Katalog-Nr.: 109495) und 2 µl DNase I (Roche, Katalog-Nr.: 10776785001) → Inkubation für 15 min bei 37°C
- Aufreinigung der mit DNase verdauten RNA mit Hilfe von NucAway™ Spin Columns (Ambion, Katalog-Nr.: AM10070) nach Angaben des Herstellers
- Kontrolle der Sondenqualität und Abschätzen der Konzentration mittels Agarose-Gelelektrophorese; Lagerung der Sonden bei -80°C

2.9.4 Sondenhybridisierung und Detektion

Verwendete Puffer und Materialien

SSC (20x):
3 M NaCl
300 mM Na_3Citrat
pH 7.4

10x Salz (100 ml):
1.54 g Tris
10.78 g NaCl
0.71 g $NaH_2PO_4 * H_2O$
0.89 g $Na_2HPO_4 * 2 H_2O$
10 ml EDTA [0.5 M]
pH mit ca. 6 ml 1N HCl auf 7.5 einstellen

50x Denhardts:
1% (w/v) BSA
1% (w/v) Ficoll (SIGMA, Katalog-Nr.: P-2637)
1% (w/v) Polyvinylpyrollidon (SIGMA, Katalog-Nr.: P-5288)
mit H_2O-DEPC auffüllen, bei -20°C lagern

Hybridisierungspuffer (10 ml, der Reihenfolge nach mischen):
900 µl ddH_2O
1 ml 10x Salz
100 µl 50x Denhardts
1 ml yeast-RNA [10 mg/ml], (SIGMA, Katalog-Nr.: R-6750)
2 ml 50% (w/v) Dextransulfat (SIGMA, Katalog-Nr.: D-8906)
5 ml deion. Formamid

Waschpuffer: 1x SSC
50% Formamid
0.1% Tween (SIGMA, Katalog-Nr.: P-7949)
auffüllen mit H_2O-DEPC und Rühren mit gebackenem Magnetrührer (140°C)

MABT: 100 mM Maleinsäure
150 mM NaCl
ergibt pH von ca. 1.5
mit 10N NaOH oder NaOH Plätzchen auf pH 7.5 einstellen
+ 0.1% Tween

AP-Puffer (10 ml): 1 ml Tris pH 9.5 [1 M]
250 µl $MgCl_2$ [2 M]
333 µl NaCl [3 M]
10 µl Tween 20
240 µl Levamisol [10 mg/ml]
ad 10 ml mit H_2O-DEPC

"Boxpuffer": 10 ml Formamid
2 ml 20x SSC
8 ml ddH_2O

Blocklösung (6 ml): 4.8 ml MABT
1.2 ml Horse-Serum (10 min hitzeinaktiviert)

Um den Ausschluss von RNasen zu gewährleisten, wurde zu den aufgelisteten Puffern jeweils DEPC (1:1000) zugefügt, die Lösung Ü.N. bei RT gerührt und abschließend autoklaviert. Alternativ wurde für frisch anzusetzende Puffer DEPC-behandeltes H_2O verwendet. Des Weiteren wurden gebackene Magnetrührer und Deckgläser verwendet.

Für die Hybridisierung und Detektion der Sonde wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

1. Tag - Hybridisierung

- Objektträger (OT) mit Kryoschnitten in Kunststoffbox 30 min auftauen lassen
- 1 µl Sonde mit der entsprechenden Menge 1x TE-Puffer verdünnen (zum Beispiel 1:10, abhängig von der Ausgangskonzentration)
- 1.5 µl Sondenverdünnung mit 150 µl vorgewärmten Hybridisierungspuffer in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß mischen und für 10 min bei 70°C (Heizblock) inkubieren
- Boxpuffer für die Hybridisierung in der feuchten Kammer ansetzen
- Filterpapierstreifen in Kunststoffbox legen, Boxpuffer eingießen
- Sonde + Hybridisierungspuffer auf OT luftblasenfrei auftragen, vorsichtig Deckglas auflegen

- OT in der Box bei 68°C Ü.N. inkubieren

2. Tag - Posthybridisierung

- Waschpuffer frisch ansetzen, in drei Glasküvetten aufteilen und auf 68°C im Wasserbad oder Heizofen erwärmen
- Schnitte auf OT bei 68°C 3x mit Waschpuffer waschen (10 min, 30 min, 30 min), Waschpuffer in Formamid-Sonderabfall entsorgen
- MABT-Puffer frisch aus MAB und 0.1% Tween herstellen, 200 ml in Küvette und 10 ml in Falcon-Röhrchen abfüllen
- Schnitte bei RT für 30 min in Küvette waschen, anschließend 30 min mit je 400 µl MABT auf OT (in feuchter Kammer)
- Anschließend je 400 µl Blocklösung auf OT auftragen und 1 h bei RT in feuchter Kammer inkubieren
- 0.8 – 1 µl Anti-DIG Antikörper (Roche, Katalog-Nr.: 11093274910) mit 1.5 ml Blocklösung mischen
- jeweils 150 µl Antikörperverdünnung blasenfrei auf OT auftragen und mit Deckglas abdecken, Ü.N. in feuchter Kammer bei RT inkubieren

3. Tag – Farbreaktion

- MABT-Puffer frisch ansetzen (auf Küvetten und ein Falcon-Röhrchen verteilen)
- Schnitte auf OT 4x in MABT waschen: in Küvetten (10 min, 20 min); anschließend auf OT in Box (2x 20 min)
- AP-Puffer auftauen bzw. frisch ansetzen und filtrieren (Rotilabo®-Spritzenfilter steril, 0.22 µm, Katalog-Nr.: P664.1)
- Schnitte 2x 10 min mit je 400 µl AP-Puffer pro OT äquilibrieren
- Farblösung mit 1.5 ml AP-Puffer und 15 µl NBT/BCIP Lösung (Roche, Katalog-Nr.: 1681451) ansetzen, danach abgedunkelt arbeiten
- Jeweils 150 µl Farblösung blasenfrei auf OT auftragen und Ü.N. in feuchter Kammer (mit Aluminiumfolie abdecken) bei RT inkubieren, alternativ länger bei 4°C inkubieren

4. Tag – Eindecken

- Kaiser's Glyceringelatine (Merck, Katalog-Nr.: 1092420100) im Wasserbad auf 50°C erwärmen
- Farblösung in 1x PBS (Küvetten) auswaschen (5 min, 10 min, 30 min), Inhalt der ersten beiden Küvetten in NBT/BCIP-Sonderabfall entsorgen
- nach Waschen in PBS, Schnitte mit je 190 µl Glyceringelatine luftblasenfrei eindecken, überschüssige Flüssigkeit mit Papiertüchern abnehmen und OT Ü.N. im Abzug ausdampfen lassen

2.10 Yeast-Two-Hybrid Methoden

Verwendete Puffer und Materialien

3-AT (Sigma):	3-Amino-1,2,4-Triazol
β-Mercaptoethanol (Roth):	14.4 M
Glass Beads (Sigma):	Partikelgröße 400-600 µm
Glukose (Merck):	20% Glukose, steril-filtriert
ONPG:	O-nitrophenyl-ß-D-galactopyranosid
ONPG-Lösung:	40 mg ONPG in 10 ml Z-Puffer
Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol 25:24:1 (Roth):	gebrauchsfertige Lösung
Yeast Lysis Solution:	100 mM Tris/HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA 1% SDS 2% TritonX-100
X-gal (Roth):	5-bromo-5-chloro-3-indolyl-ß-D-galactosid
X-gal Stocklösung:	X-gal mit einer Konzentration von 20 $^{mg}/_{ml}$ in DMF lösen und lichtgeschützt bei -20°C aufbewahren
Z-Puffer:	$Na_2HPO_4 * 7 H_2O$ 16.1 $^{g}/_{l}$ $NaH_2PO_4 * H_2O$ 5.5 $^{g}/_{l}$ KCl 0.75 $^{g}/_{l}$ $MgSO_4 * 7 H_2O$ 0.246 $^{g}/_{l}$ pH auf 7.0 einstellen, autoklavieren

Z-Puffer/ X-gal-Lösung:
100 ml Z-Puffer
0.27 ml ß-Mercaptoethanol
1.67 ml X-gal Stocklösung

Z-Puffer mit ß-Mercaptoethanol:
100 ml Z-Puffer
270 µl ß-Mercaptoethanol

Nährmedien für Hefen:

YPD (Vollmedium):

10 g	Hefeextrakt
10 g	Pepton
100 mg	Adeninsulfat (Sigma)
ad 1000 ml	H_2O bidest.

Nach Einstellen des pH auf 6.0 mit HCl wurde für 25 min bei 121°C autoklaviert und dann 20 g Glucose zugegeben.

Selektivmedium (SC Medium):
13.4 g Yeast Nitrogen Base (Sigma)
nach Herstellerangabe Selektivmedium

Nach Einstellen des pH auf 5.9 mit NaOH wurde für 20 min bei 121°C autoklaviert und dann 20g Glucose zugegeben.

Platten: Den entsprechenden Plattenmedien wurde 2% Bacto-Agar (BD) zugesetzt.

3-AT-Platten: Nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen auf 65°C wurde 3-AT in der gewünschten Konzentration zu dem SC Medium gegeben.

Verwendete Selektivmedien:
-Leu-Trp (Sigma)
-Leu-Trp-His (BD)
-Leu-Trp-Ura (BD)
-Leu-Trp-His-Ura (BD)

Bei den Selektivmedien handelt es sich um Aminosäuregemische, die mit Ausnahme der genannten alle essentiellen Aminosäuren enthalten.

2.10.1 Stammhaltung von Hefen

Die MaV-Stämme wurden auf YPD- oder Selektivplatten ausgestrichen und 2 Tage bei 30°C bebrütet, bis Kolonien sichtbar waren. Diese Platten wurden mit Parafilm versiegelt und bis zu 8 Wochen bei 4°C aufbewahrt. Dauerkulturen wurden zu gleichen Teilen aus frischen

Übernachtkulturen und 30% steril filtriertem Glycerin angelegt, wobei das Tieffrieren zunächst in einer Mischung aus Ethanol und Trockeneis erfolgte, bevor die dauerhafte Lagerung bei -80°C begann. Ein erneutes Animpfen erfolgte stets auf YPD-Platten. Alle Kulturen wurden aus einer Einzelkolonie angeimpft.

2.10.2 Transformation von Hefen

Zur Transformation von Hefen wurde das „Grow´n´Glow High Efficiency Yeast Transformation Kit" der Firma MoBiTec (Katalog-Nr. 2200-1) benutzt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.10.3 Isolation von Plasmid-DNA aus Hefen

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Hefen war für die Identifizierung der putativen Interaktionspartner von MEGAP und für die Transformation der entsprechenden Plasmide in Bakterien erforderlich. Hierzu wurden Plasmide aus flüssigen Hefekulturen nach folgendem Protokoll isoliert (Hoffman and Winston, 1987)

- aus einer einzelnen Kolonie eine Übernachtkultur (ÜNK) im entsprechenden Selektivmedium animpfen und mindestens 16 h bei 30°C und 160 rpm inkubieren
- 1.5 ml der ÜNK für 5 min bei 13000 rpm abzentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet in 200 µl Yeast Lysis Solution resuspendieren
- 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkohol (25:24:1) und 0.3 g Glass Beads (Partikelgröße 400-600 µm, Sigma, Bestellnr. G8772) zugeben und 2 min vortexen
- 5 min bei 13000 rpm abzentrifugieren und den Überstand in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe von $^{1}/_{10}$ Volumen 3M NaAc und 2.5x Volumen Ethanol
- 40 min bei 13000 rpm abzentrifugieren; Überstand verwerfen und Pellet in 100 µl Ethanol resuspendieren
- 2 min bei 13000 rpm abzentrifugieren, Überstand verwerfen, Pellet in 20 µl H_2O bidest. lösen, davon 2 µl in die Bakterien-Transformation einsetzen

2.10.4 Das Yeast-Two-Hybrid System

Das „Yeast-Two-Hybrid“ System ist eine molekulargenetische Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von Protein-Protein Interaktionen. Mit diesem System können cDNA-Bibliotheken gezielt nach bisher unbekannten Interaktionspartnern durchsucht werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, zwei bereits bekannte Proteine auf eine mögliche Interaktion zu testen. In dieser Arbeit wurde der erste der beiden Ansätze verwendet, um neue Interaktionspartner für das Protein MEGAP zu suchen. Das „Yeast-Two-Hybrid“ System basiert auf der Beschaffenheit vieler eukaryontischer Transkriptionsfaktoren, die aus zwei voneinander trennbaren, funktionell unabhängigen Domänen aufgebaut sind. In Saccharomyces cerevisiae bedient man sich normalerweise des Transkriptionsfaktors GAL4. Dieser besitzt zwei verschiedene Domänen, eine zum Binden an die DNA (Bindedomäne, GAL4-DB) und eine, welche die Transkription aktiviert (Aktivierungsdomäne, GAL4-AD). Obwohl die beiden Domänen sich normalerweise auf derselben Polypeptidkette befinden, sind diese auch dann wirksam, wenn sie von zwei unterschiedlichen Proteinen über nichtkovalente Protein-Protein Interaktionen zusammengebracht werden. Dazu bedient man sich zweier in Hefe kompatibler Expressionsvektoren. Jedes der beiden Plasmide trägt jeweils ein für das entsprechende Experiment konstruiertes Fusionsgen. Dieses kodiert im ersten Fall für ein Hybridprotein, das aus der GAL4-DB besteht und an der sich die Aminosäuresequenz anschließt, für die ein potentieller Bindungspartner gefunden werden soll („bait“, Köderprotein). Das zweite Plasmid kodiert ein Hybridprotein, das sich aus der GAL4-AD und im Anschluss aus einem möglichen Bindepartner für den „bait“ zusammensetzt („prey“, Beuteprotein). Ein Hefestamm wird mit beiden Plasmiden transformiert, der kein funktionierendes *GAL4*-Gen hat und ein oder mehrere Reportergene trägt, denen eine Bindestelle für den GAL4-Transkriptionsfaktor vorgeschaltet ist. Als Reporter dieser Interaktion fungieren Gene, die entweder bestimmte Aminosäuren bzw. Basen herstellen können (z. B. Histidin, Uracil oder Adenin) oder eine optische Erkennung ermöglichen (z. B. einen Farbumschlag katalysiert durch das *lacZ*-Gen). Wenn es zwischen „bait“ und „prey“ zu einer Interaktion kommt, resultiert daraus in der Regel eine funktionelle Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsaktivators, was eine Expression der Reportergene zur Folge hat. Letzteres kann durch Wachstum auf entsprechenden Selektionsmedien nachgewiesen werden. Zur Erhöhung der Spezifität wurden in dem benutzten System (Invitrogen) drei verschiedene Reportergene (*HIS3*, *URA3* und *lacZ*) mit voneinander unabhängigen Promotoren eingesetzt (Abbildung 12).

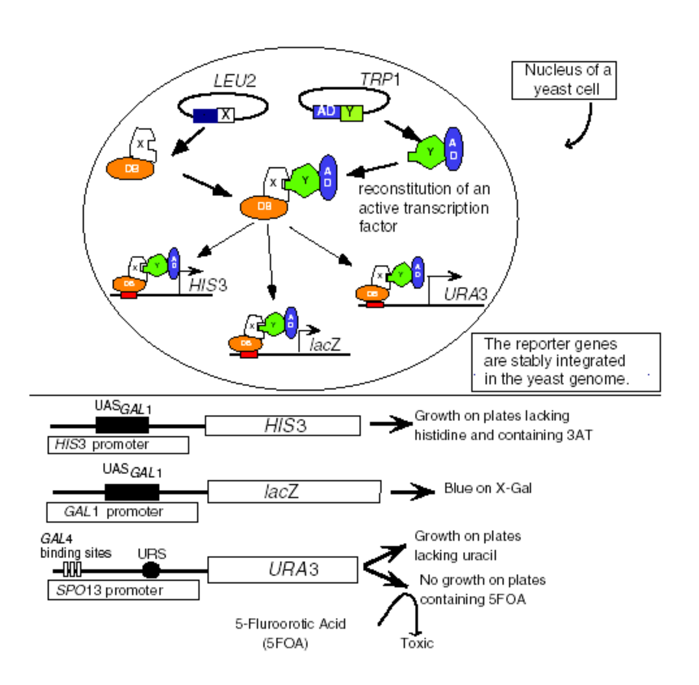


Abbildung 12: Der Screen mit drei Reportergenen (*nach Invitrogen*); Die Zeichnung veranschaulicht die bei Expression resultierenden Phänotypen der drei Reportergene *HIS3* (Wachstum auf –His-Platten), *lacZ* (blauer Farbumschlag im X-gal-Filter-Assay) und *URA3* (Wachstum auf –Ura-Platten).

Aufgrund einer höheren Transformationseffizienz wurde der Hefestamm MaV203™ für den Yeast-Two-Hybrid-Screen ausgewählt (siehe Anhang 5.2). Bei diesem Stamm kann die Aktivierung der Reportergene *HIS3*, *lacZ* und *URA3* beobachtet werden (Abbildung 12).

2.10.4.1 Vorbereitung des Yeast-Two-Hybrid Screens

Klonierung C-terminaler MEGAP-Fragmente in „Yeast-Two-Hybrid“-Vektoren

In Anbetracht der Tatsache, dass *MEGAP* für ein Protein mit einer Größe von ca. 160 kDa kodiert, war die Expression des gesamten Proteins in Hefen nicht möglich. Im Rahmen der Analyse der Interaktionen zwischen MEGAP und dem Transmembranrezeptor Robo1 sowie zwischen MEGAP und WAVE-1 wurde die MEGAP-SH3 Domäne bereits als essentielle Komponente für Protein-Protein Interaktionen isoliert (Wong *et al.*, 2001; Soderling *et al.*, 2002). Daher wurde der C-terminale Bereich von MEGAP (MEGAP-C), welcher auch die SH3-Domäne enthält, für die Suche nach Interaktionspartnern verwendet (Abbildung 13). Zur Durchführung eines MEGAP-spezifischen „Yeast-Two-Hybrid Screens" sollte das kommerziell erhältliche „ProQuest Two-Hybrid System with Gateway Technology“ der Firma Invitrogen verwendet werden. Dazu wurde die *MEGAP-C* kodierende cDNA zunächst

in den pENTR2B-Vektor kloniert und anschließend über das Gateway-System (Abschnitt 2.6) in den pDEST32-Vektor für die Expression in Hefen transferiert.
Die Einhaltung des korrekten Leserasters wurde nach der Generierung des pENTRY-Vektors überprüft, da im Verlauf der Gateway Klonierung keine Sequenzänderungen erfolgen.

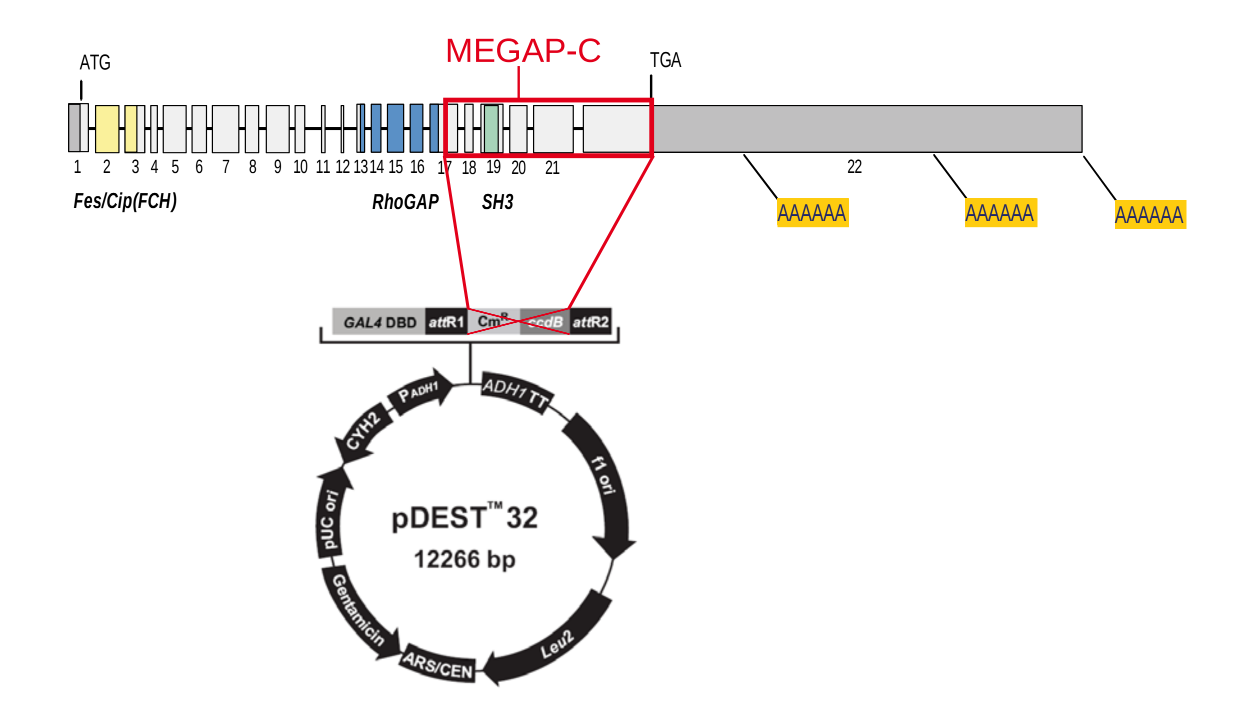


Abbildung 13: Schematische Darstellung des *MEGAP-C* Konstruktes für den Yeast-Two-Hybrid Screen. Das C-terminale *MEGAP*-Fragment wurde mittels LR-Reaktion aus einem ENTRY-Vektor (pENTR-*MEGAP-C*) in den pDEST32-Vektor transferiert, welcher auch die DNA-bindende Domäne bzw. den „bait“ exprimiert.

Zusätzlich zu dem in Abbildung 13 dargestellten MEGAP-C Expressionskonstrukt wurde ein kleineres *MEGAP*-Fragment in den pDEST32-Vektor kloniert, welches hauptsächlich die SH3- und die so genannte KID-Domäne enthielt (*MEGAP-SH3/KID*). Beide Konstrukte wurden bezüglich ihrer Eignung im Rahmen der 3AT-Titration getestet.

Analog zur Klonierung der pDEST32-Expressionskonstrukte für die DNA-bindende Domäne des Transkriptionsfaktors GAL4 wurden die CC3-Domäne von Robo1 und WAVE-1 jeweils in pDEST22 kloniert, mit welchem die GAL4 Aktivierungsdomäne exprimiert werden kann. Sowohl pDEST22-*ROBO-CC31* als auch pDEST22-*WAVE-1* wurden als Positivkontrollen für die Interaktion mit MEGAP-C eingesetzt.

Test auf MEGAP-Autoaktivierung und Bestimmung der 3AT-Konzentration (Titration)

Ein inhärentes Problem eines „Yeast-Two-Hybrid Screens” besteht in der Identifizierung falsch-positiver Klone. Diese Situation tritt ein, wenn das zu testende Protein („bait“) oder der putative Interaktionspartner („prey“) autoaktivierende Eigenschaften besitzen, also allein die Transkription eines Reportergens initiieren können. Um die Zahl falsch-positiver Klone möglichst gering zu halten, musste zunächst die potentielle Autoaktivierung durch den „bait“ (MEGAP-C bzw. MEGAP-SH3/KID) ermittelt und diese durch Zugabe steigender Konzentrationen des kompetetiven Inhibitors 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) unterdrückt werden.

Die Titration wurde auf -Leu-Trp-His-Platten durchgeführt, da pDEST32 (in diesem Fall pDEST32-*MEGAP-C* bzw. pDEST32-*MEGAP-SH3/KID*) das Gen zur Synthese der essentiellen Aminosäure Leucin trägt und pDEST22 (parentaler Vektor ohne Insert) das zur Synthese der essentiellen Aminosäure Tryptophan. Dieses Vorgehen erlaubte daher das spezifische Wachstum doppelt transformierter Hefestämme.

Als Selektionsmarker für die Autoaktivierung wurde Histidin verwendet, da diese essentielle Aminosäure nur bei erfolgter Proteininteraktion oder vorhandener Autoaktivierung vom transformierten Hefestamm gebildet werden kann. Zusätzlich wurde den Platten 3-AT, ein spezifischer Inhibitor der Histidinsynthese, in steigenden Konzentrationen zugegeben, um die Autoaktivierung und das damit verbundene Wachstum zu unterdrücken. Im Vorversuch wurden je 2µl frischer Übernachtkultur der Kontrollstämme (A-E) in 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnungen auf Selektionsplatten mit steigenden 3-AT Konzentrationen (10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM) aufgebracht und drei Tage bei 30°C inkubiert. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde eine Konzentration von 25 mM 3-AT ausgewählt, welche anschließend mit einem Kontrollexperiment verifiziert wurde. Analog zur Vorselektion der 3-AT Konzentration wurden je 2µl frischer Übernachtkultur in 1:10 und 1:100 Verdünnungen auf -Leu-Trp-His-Platten mit 25 mM 3-AT aufgebracht. Hierbei wurden die Kontrollstämme B, C und D sowie mit pDEST32-*MEGAP-C* bzw. pDEST32-*MEGAP-SH3/KID* und pDEST22-*ROBO1-CC3*, -*WAVE-1* und pDEST22 (parentaler Vektor) doppelt transformierte Hefestämme verwendet (Abbildung 14). Das Ergebnis wurde wieder nach drei Tagen Inkubation bei 30°C ausgewertet.

Wie Abbildung 14 zeigt, besitzen beide MEGAP-Fragmente in Co-Transformation mit pDEST22 (III und VI) keine autoaktivierenden Eigenschaften bei Zugabe von 25 mM 3-AT. Des Weiteren konnte sowohl für die Konstrukte pDEST32-*MEGAP-C* und pDEST32-*MEGAP-SH3/KID* die Interaktion zwischen MEGAP und der CC3-Domäne von Robo1 im

Hefesystem bestätigt werden. Im Gegensatz dazu war kein Hefewachstum bei den mit *MEGAP-C* und *WAVE-1* bzw. *MEGAP-SH3/KID* und *WAVE-1* co-transformierten Klonen zu beobachten. Der Kontrollstamm B, welcher schwach interagierende Proteine exprimiert, zeigte ebenfalls kein Wachstum. Daher konnten möglicherweise sehr schwache Interaktionen im Yeast-Two-Hybrid Screen nicht repräsentiert werden. Da jedoch die Interaktion zwischen MEGAP und WAVE-1 im Hefesystem bisher noch nicht gezeigt wurde, kann hier keine Aussage bezüglich des fehlenden Wachstums getroffen werden.

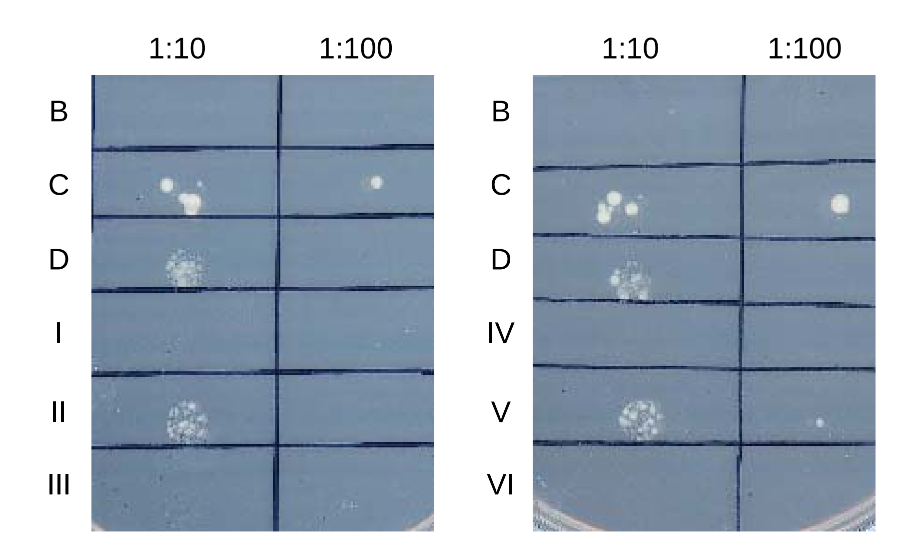


Abbildung 14: Kontrollexperiment der 3-AT-Titration unter Verwendung von 25 mM 3-AT und 72h Inkubation bei 30°C. Neben den Kontrollstämmen B-D (Anhang 5.2) wurden folgende Hefeklone analysiert: **I:** pDEST32-*MEGAP-C* + pDEST22-*WAVE-1*, **II:** pDEST32-*MEGAP-C* + pDEST22-*ROBO1-CC3*, **III:** pDEST32-*MEGAP-C* + pDEST22 (parentaler Vektor), **IV:** pDEST32-*MEGAP-SH3/KID* + pDEST22-*WAVE-1*, **V:** pDEST32-*MEGAP-SH3/KID* + pDEST22-*ROBO1-CC3*, **VI:** pDEST32-*MEGAP-SH3/KID* + pDEST22 (parentaler Vektor)

Im Rahmen der 3-AT-Titration konnten keine Unterschiede zwischen MEGAP-C und MEGAP-SH3/KID bezüglich der Interaktion mit Robo1 und ihrer autoaktivierenden Eigenschaften festgestellt werden. In diesem Fall wurde das größere Fragment MEGAP-C für den Yeast-Two-Hybrid Screen ausgewählt, da sich größere Proteine unter Umständen besser falten.

2.10.4.2 Verwendung einer humanen fötalen Gehirn cDNA-Bibliothek

Im Rahmen der Expressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass *MEGAP* hauptsächlich im Nervensystem exprimiert wird. Insbesondere während der Embryogenese wird *MEGAP* sehr stark in großen Bereichen des sich entwickelnden Gehirns und im Neuralrohr exprimiert. Da MEGAP eine wichtige Rolle bei der Entwicklung kognitiver Funktionen einzunehmen

scheint, wurde in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf die Identifizierung von Interaktionspartnern gelegt, welche für die Entwicklung des Gehirns physiologisch relevant sind. Somit wurde für den primären Yeast-Two-Hybrid Screen eine „Human Fetal Brain“-cDNA-Bibliothek (Invitrogen; Katalog-Nr.: 11386-026) eingesetzt.

2.10.4.3 Durchführung des Yeast-Two-Hybrid Screens

Um eine möglichst hohe Anzahl der in der cDNA-Bibliothek vorhandenen Klone nach putativen MEGAP-Interaktionspartnern zu durchsuchen, wurden für den Yeast-Two-Hybrid Screen 38 Einzeltransformationen (Abschnitt 2.10.2) mit je 0.77 µg cDNA-Bibliothek (Human Fetal Brain, 29.3 µg gesamt) durchgeführt. Hierzu wurde ein Hefeklon, welcher bereits den entsprechenden „bait“ (pDEST32-*MEGAP-C*) enthielt, in einem Liter Selektivmedium bis zum Erreichen einer Zelldichte von OD_{600} = 0.4-0.6 vermehrt (30°C, 160 rpm). Nach der Transformation wurden alle Ansätze vereinigt und je 300 µl transformierte Hefezellen auf eine Agar-Platte (∅ 14.5cm) mit Selektivmedium (-Trp, -Leu, -His; 25 mM 3-AT) ausplattiert. Von dem vereinigten Transformationsansatz wurden 10 µl entnommen und 1:100 verdünnt. Je 100 µl dieser Verdünnung wurden auf drei kleinen Platten (∅ 10 cm; Selektion –Trp, -Leu) ausplattiert, um daraus die Transformationseffizienz des Screens berechnen zu können. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Anzahl der Hefeklone auf den drei 10cm-Platten bestimmt und der Mittelwert gebildet. Die Transformationseffizienz ließ sich wie folgt berechnen: Anzahl der Klone (Mittelwert) x 100 (ausplattiertes Volumen 100 µl) x Anzahl Platten (umrechnen auf große Platten mit je 400 cm^2) x 10 (entnommenes Ausgangsvolumen). Insgesamt wurden die transformierten Hefen auf 111 Agar-Platten mit Selektivmedium verteilt und für 72 h bei 30°C inkubiert. Die größten gewachsenen Klone wurden anschließend in mit Selektivmedium (-Trp, -Leu) gefüllten 96-Wellplatten (je 190 µl Medium pro Well) überführt, um Masterplatten anzulegen. Anschließend wurde die Aktivierung der Reportergene in den Klonen getestet: Wachstum auf Agar-Platten ohne Histidin bzw. Uracil sowie Nachweis und Quantifizierung der gebildeten ß-Galactosidase (Abschnitt 2.10.4.4 und 2.10.4.5).

2.10.4.4 ß-Galactosidase Flüssigassay

Das Enzym ß-Galactosidase wird unter den Bedingungen eines Yeast-Two-Hybrid Screens nur dann gebildet, wenn eine Interaktion zwischen den beiden zu testenden Partnern

stattfindet. Nur in diesem Fall wird das *lacZ* Gen (eines der drei Reportergene, Abschnitt 2.10.4) exprimiert und ist somit aktiv. Der Nachweis für die ß-Galactosidaseaktivität wird mit dem chromogenen Substrat ONPG (O-nitrophenyl-ß-D-galactopyranosid) durchgeführt, welches in wässrigen Lösungen farblos ist. ONPG wird durch ß-Galactosidase zu Galactose und o-Nitrophenol hydrolysiert. Das Absorptionsmaximum von o-Nitrophenol liegt bei alkalischem pH bei 420 nm. Wenn ONPG im Überschuss in der Reaktion vorliegt, ist die Menge des gebildeten o-Nitrophenols proportional zur Menge der ß-Galactosidase in der Probe und erlaubt so eine Quantifizierung der Interaktionsstärke der beiden Proteine.

Hierbei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- eine Einzelkolonie in 10 ml Selektivmedium animpfen und Ü.N. bei 160 rpm und 30°C inkubieren, um eine OD_{600} = 0.4 – 0.8 zu erhalten
- 5 min bei 2200 rpm abzentrifugieren und den Überstand verwerfen
- Pellet in 1.5 ml Z-Puffer resuspendieren und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß transferieren
- 2 min bei 13000 rpm abzentrifugieren und den Überstand verwerfen
- Lösen des Pellets in 200 µl Z-Puffer
- 10 µl der Zellsuspension entnehmen und in 990 µl H_2O bidest. 1:100 verdünnen; Messen der OD_{600}, Leerwertbestimmung mit H_2O bidest.
- Rest der Probe in flüssigem Stickstoff schockgefrieren (zum Aufbrechen der Zellen); falls zu diesem Zeitpunkt unterbrochen werden soll: Aufbewahrung der Zellen auf -80°C
- für ß-Galactosidase-Flüssigassay Zellen bei RT auftauen lassen
- 700 µl Z-Puffer mit ß-ME zugeben
- zum Starten der Reaktion Zugabe von 160 µl ONPG-Lösung, Inkubation unter leichtem Schütteln bei 30°C
- genaue Zeit stoppen ab Zugabe von ONPG bis zum Farbumschlag nach gelb
- Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 400 µl 1M Na_2CO_3, Farbe bleibt stabil
- 1 min bei 13000 rpm abzentrifugieren und den Überstand in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführen
- Messen der OD_{420} in entsprechender Verdünnung, so dass OD_{420} zwischen 0.02-1.0 gelesen werden kann (linearer Bereich); Leerwertbestimmung mit H_2O bidest.
- Berechnung der ß-Gal-Aktivität in units:
  ß-Gal-Units = OD_{420} x 1000 / Δt_{min} x OD_{600}

- Es wurde stets eine Negativkontrolle sowie Kontrollstämme (Invitrogen) bekannter Interaktionsstärke als Positivkontrollen mitgeführt (Tabelle 12); nach maximal 3 h (oder bei einem beobachteten Farbumschlag der schwächsten bekannten Interaktion) wird das Experiment abgebrochen.

2.10.4.5 X-Gal-Filter-Assay

Das Prinzip des X-Gal-Filter-Assays entspricht dem des ß-Galactosidase Flüssigassays mit ONPG, auch hier wird die Aktivität der ß-Galactosidase bestimmt. Der Unterschied besteht darin, dass in diesem Assay keine quantitative Bestimmung des (blauen) Farbumschlags möglich ist. Das Vorgehen war wie folgt (modifiziert nach Invitrogen, Benutzerhandbuch des „ProQuest Two-Hybrid“ Systems):

- eine Hybond-NX-Nylonmembran (Amersham) wurde auf eine passende Größe zurechtgeschnitten und unter UV-Bestrahlung (Stratalinker) von beiden Seiten sterilisiert
- diese Membran wurde auf eine Platte (Selektionsmedium) aufgebracht, eventuelle Luftblasen wurden entfernt und von der Masterplatte die zu testenden Hefeklonen überimpft
- Inkubation bei 30°C, bis Einzelkolonien auf der Membran sichtbar waren (ca. 48 h)
- daraufhin wurde die Membran mit einer Pinzette von der Platte abgehoben, für 10 sec in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei RT aufgetaut
- während dieser Zeit wurde Whatman-Papier auf eine passende Größe zurechtgeschnitten, in Petrischalen (15 cm Durchmesser) überführt und mit Z-Puffer/ X-gal-Lösung angefeuchtet
- die Membran wurde auf das Papier aufgebracht (Kolonieseite nach oben, Vermeidung von Luftblasen) und die einzelnen Kolonien wurden ebenfalls mit Z-Puffer/ X-gal-Lösung beträufelt
- anschließend wurde bei 37°C inkubiert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Petrischale leicht schräg stand, so dass überschüssiger Z-Puffer/ X-gal-Lösung sich nicht auf der Membran sammelt
- nach 24 h wurde das Experiment abgebrochen und das Ergebnis ausgewertet

2.11 Kultivierung von Zelllinien

Medium: DMEM high Glucose (Gibco), supplementiert mit 10% Fötalem Kälberserum bzw. Neugeborenem Kälberserum (PAA) und Penicillin/Streptomycin (Gibco).

Die Zelllinien HEK293 (humane embryonale Nierenzellen, CRL-1573) und NIH-3T3 (Maus-Fibroblasten, CRL-1658) wurden von der American Tissue Culture Cooperation (ATCC) bezogen. Die Zellen wurden bei 37°C und einer 5% CO_2 Konzentration in 250 ml Zellkulturflaschen mit Filter (Greiner) liegend inkubiert. Alle 2 - 3 Tage wurde der Mediumüberstand entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit ca. 2 ml Trypsin von der Kulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden anschließend in einem Verhältnis von 1:10 (NIH-3T3) bzw. 1:20 (HEK293) in frischem Medium neu ausgesät.

2.12 Transfektion von Zelllinien

HEK293 und NIH-3T3 Zellen wurden mit dem Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion auf ∅10cm Zellkulturschalen (für Zelllysate) bzw. 24-Well Zellkulturschalen (mit ∅12 mm Deckgläsern für Immunfluoreszenz) in Antibiotika-freiem Medium ausgesät. HEK293 und NIH-3T3 Zellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 30% transfiziert.

Plattentyp	*Wachstumsfläche*	*Totalvolumen Medium*	*Medium für Verdünnung*	*Lipofectamine™ 2000*	*DNA Menge*
10 cm Platte	60 cm^2	10 ml	2x 1.5 ml	60 µl	24 µg
24-Well	2 cm^2	0.5-1 ml	2x 50 µl	2 µl	0.8 µg

Nach Empfehlung des Herstellers wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- In zwei sterilen 1.5 ml Reaktionsgefäßen wurde die gleiche Menge Serum-freies Medium (Opti-MEM® I with GlutaMAX™ I, Gibco) vorgelegt.
- Zugabe der DNA in das erste Gefäß, kurzes Mischen.
- Zugabe von Lipofectamine™ 2000 in das zweite Gefäß, nach vorsichtigem Mischen Inkubation bei RT für 5 min.
- Zugabe der verdünnten DNA zum Medium mit Lipofectamine™ 2000, nach vorsichtigem Mischen Inkubation bei RT für 20 min.
- Zugabe des Lipofectamine™ 2000-DNA Gemischs zu den Zellen.
- Mediumwechsel 4 h nach der Transfektion.

2.13 Immunfluoreszenz

Verwendete Puffer und Materialien

Lab-Tek™ II Chambered Coverglass,	4 Well (Nunc)
Bovine Plasma Fibronectin	Invitrogen
Fixierungslösung	4% PFA / Sucrose in 1x PBS
Blocklösung	3% Bovines Serum Albumin Fraktion V (ICN) in 1x PBS / 0.1% Tween
Phalloidin-TRITC	SIGMA
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenyl-indole, 2 mg/ml; Serva
Vectashield mounting medium	Vector Labs

Die verwendeten Zellen wurden für die Immunfluoreszenz-Experimente mit einer Dichte von ca. 30% auf beschichtete Glasdeckgläser (∅ 12 mm) oder in 4-Well Kammern mit Deckglasboden ausgesät. Für HEK293 Zellen genügt die Beschichtung der Deckgläser mit Poly-D-Lysin. Bei Versuchen mit NIH-3T3 Zellen wurde eine Beschichtung mit Fibronektin vorgenommen um die Zelladhäsion zu verbessern. Die adhärenten Zellen wurden transfiziert und am nächsten Tag fixiert. Anschließend fand die Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern statt. Hierbei wurde wie folgt vorgegangen:

- Medium von den transfizierten Zellen entfernen, Zellen mit 37°C warmen 1x PBS waschen
- Zellen mit 4% PFA / Sucrose in 1x PBS für 10 min bei 37°C fixieren
- Zellen 3x 5 min mit 1x PBS waschen
- Zellen 1x 10 min mit 1x PBS / 0.1% Tween-20 (PBS-T) permeabilisieren
- Blocking: 60 min mit 3% BSA in 1x PBS-T
- 1. Antikörper 1:100 – 1:600 in 1% BSA / 1x PBS-T verdünnen. Inkubation der Zellen in einer feuchten Kammer mit dem primären Antikörper für 60 min bei RT oder 4°C Ü.N.
- Waschen 3x 5 min mit 1x PBS-T
- Zweiten, fluoreszenzmarkierten Antikörper 1:100 – 1:600 in 1% BSA / 1x PBS-T verdünnen (Phalloidin/TRITC: 1:700). Inkubation der Zellen in einer dunklen, feuchten Kammer mit dem sekundären Antikörper für 60 min bei RT.
- Waschen 3x 5 min mit 1x PBS-T

- Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (30 ng/ml in 1x PBS) für 3 min
- Abspülen der Präparate mit H_2O bidest. und Lufttrocknen (im Dunkeln)
- Eindecken der Präparate mit Vectashield
- Bei Immunfluoreszenz in Deckglaskammern Überschichten der Zellen mit 500 µl H_2O nach der DAPI-Färbung

2.14 Fluoreszenzmikroskopie und „Live Cell Imaging“

Fixierte und lebende Zellen wurden mit einem Nikon ECLIPSE Ti Mikroskop aufgenommen. Hierbei wurde entweder mit einem Nikon 60x PlanApo TIRF NA 1.45 oder mit einem Nikon 100x PlanApo TIRF NA 1.45 Objektiv gearbeitet. Die Aufnahmen von EYFP, mCherry und dem DIC Kontrast erfolgten mit Hilfe einer Hamamatsu ORCA-AG hochauflösenden CCD Kamera unter Anwendung der NIS-Elements 3.0 Software.
Insbesondere für die Analyse der Dynamik von auswachsenden Lamellipodien wurden lebende Zellen (NIH-3T3 Fibroblasten) aufgenommen („Live Cell Imaging“). Diese wurden auf Fibronektin-beschichtete (5µg/cm^2) 4-Well Kammern mit Deckglasboden ausgesät und mit EYFP- bzw. mCherry-Expressionskonstrukten für MEGAP und Lamellipodin transfiziert. Das Medium wurde 4 h nach der Transfektion gewechselt und durch Serum-reduziertes Medium ersetzt. Das „Live Cell Imaging“ erfolgte unter Einbindung des Nikon Perfect Focus Systems, um Fokusschwankungen zu vermeiden. Während der Filmaufnahmen wurden die Zellen in Opti-MEM I mit Glutamax, supplementiert mit 0.1% Neugeborenem Kälberserum und Penicillin/Streptomycin, gehalten. Mit Hilfe einer Tokai Hit Umweltkammer konnten die Zellen während der Aufnahme bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert werden. Die Stimulierung von Lamellipodien zu Beginn der Filmaufnahme (Zeitpunt 0 min) erfolgte durch die Zugabe von PDGF-BB (100ng/ml, Invitrogen) zu den Zellen direkt in der Kammer. Die Daten wurden mit NIS-Elements 3.0, ImageJ und Photoshop bearbeitet.

2.15 Kymographie

Da eine stimulierte Zelle in einem dynamischen Wechsel mehrfach Lamellipodien ausbildet und gebildete Zellfortsätze wieder zurückzieht, wurden für die Einhaltung konstanter Bedingungen jeweils die primären Lamellipodien direkt nach der Stimulierung der Zellen durch PDGF vermessen. Die Filmaufnahmen der stimulierten NIH-3T3 Zellen wurden analysiert, indem eine 1-Pixel-breite Linie in einem Winkel von 90° über das Lamellipodium

in Wachstumsrichtung gezeichnet wurde (Abbildung 15A) (Krause et al., 2004). In Anlehnung an die SACED Methode (Hinz et al., 1999) und mit Hilfe der Anwendung eines Kymograph Makros für ImageJ wurde das Bild dieser Linie von jeder Einzelaufnahme des Films kopiert und entlang der x-Achse eingefügt. Das für einen Filmausschnitt generierte, zusammengesetzte Kymograph-Bild stellte die räumliche Bewegung der Zellmembran in Abhängigkeit von der Zeit dar. Über das Vermessen der Steigung von primären Wachstumsmaxima der gebildeten Lamellipodien (dx/dt) konnte deren Wachstumsgeschwindigkeit berechnet werden (µm/min).

Zusätzlich zur Quantifizierung der Wachstumsgeschwindigkeiten primärer Lamellipodien wurden deren maximale Umfänge nach PDGF-Stimulierung im Verhältnis zum Umfang der gesamten, unstimulierten Zelle (serum starved) bestimmt (Abbildung 15B). Die Umfänge einzelner Lamellipodien bzw. der ganzen Zelle wurden ebenfalls mit Hilfe der ImageJ Software vermessen.

Die statistische Analyse der Wachstumsgeschwindigkeiten und Umfangverhältnisse der gebildeten Lamellipodien wurde mit der SAS V9.1 Software für Windows unter Anwendung eines generalisierten linearen Modells mit wiederholten Messungen durchgeführt. Globale Tests und multiple paarweise post hoc Vergleiche mit dem Tukey Test wurden durchgeführt, wobei statistische Signifikanz bei einem p-Wert von $p \leq 0.05$ angenommen wurde.

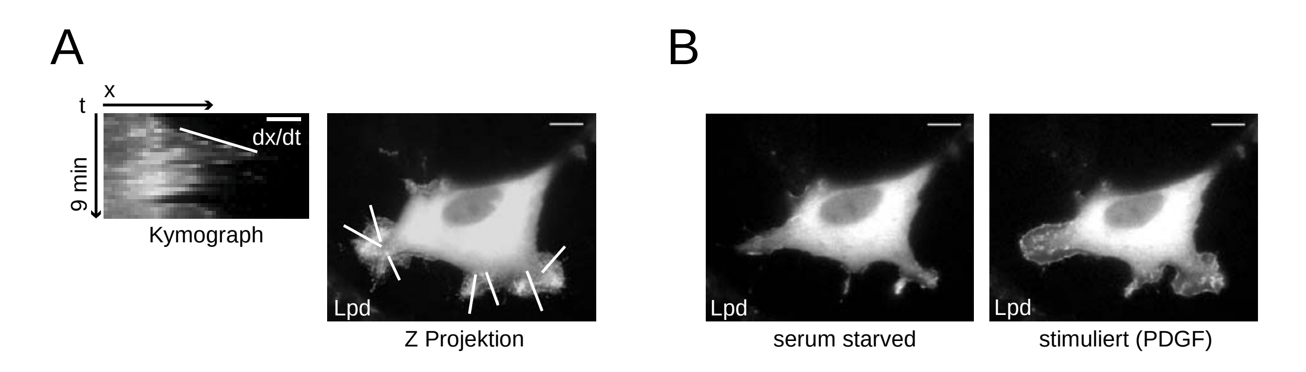


Abbildung 15: Quantifizierung von Lamellipodien-Wachstumsgeschwindigkeiten und –Umfängen, Darstellung anhand von EYFP-Lamellipodin (Lpd) transfizierten NIH-3T3 Zellen: **A)** Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeit von Lamellipodien (µm/min) mit Hilfe von Kymograph-Bildern, wobei das Auswachsen eines Lamellipodiums (dx) in Korrelation zur Änderung der Zeit (dt) gestellt wird. Die Steigung dx/dt gibt dann die jeweilige Geschwindigkeit an. **B)** Die Umfänge der einzelnen Lamellipodien einer stimulierten Zelle wurden jeweils zum Zeitpunkt der maximalen Größe vermessen und addiert. Abschließend wurde das Verhältnis aus der Summe der Lamellipodienumfänge und dem Zellumfang der unstimulierten Zelle (serum starved) berechnet. Die Maßstabsbalken in (A) und (B) entsprechen 10 µm bzw. 2 µm (Kymograph)

2.16 TIRF-Mikroskopie

In dieser Arbeit wurde neben der klassischen Epifluoreszenzmikroskopie (Abschnitt 2.14) die „Total Internal Reflection Fluorescence“ (TIRF) Mikroskopie eingesetzt, um gezielt Strukturen an der Adhäsionsfläche zwischen Zelle und Objektträger zu analysieren. Für die TIRF-Experimente wurden die Zellen analog zum in Abschnitt 2.14 beschriebenen Protokoll vorbereitet. Sowohl das „Live Cell Imaging“ als auch die Aufnahme von fixierten Zellen erfolgte in Lab-Tek™ II 4 Well Deckglaskammern, wobei fixierte Zellen nach der Färbung mit Wasser überschichtet wurden.

Die physikalische Grundlage der TIRF-Mikroskopie beruht auf der Erzeugung einer evaneszenten Welle, welche bei der Totalreflexion eines Lichtstrahls an der Grenzfläche zweier Medien (n_0 und n_1) entsteht (Abbildung 16). Für die spezifische Anregung einzelner Fluoreszenzfarbstoffe werden bei der TIRF-Mikroskopie Laser mit definierten Wellenlängen eingesetzt. Damit der Laserstrahl im Objektträger (optisch dichteres Medium n_0) total reflektiert wird, muss dessen Einfallwinkel θ größer sein als ein so genannter kritischer Winkel θ_c. Aufgrund der wellenmechanischen Eigenschaften des Lichts ergeben sich im Medium n_1 exponentiell abfallende Aufenthaltswahrscheinlichkeiten des total reflektierten Lasers. Dadurch kann sich im Medium n_1 ein geringer Teil des Laserlichts in Form einer evaneszenten Welle ausbreiten, deren Intensität mit der gleichen Exponentialfunktion abnimmt. Somit ist es möglich, dass die Fluoreszenz nur im Oberflächenbereich einer Zelle (100 – 200 nm über dem Deckglasboden) mit dem Laser angeregt wird. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der TIRF-Mikroskopie z. B. Fokale Adhäsionsstellen und die Enden von Aktinfasern visualisiert.

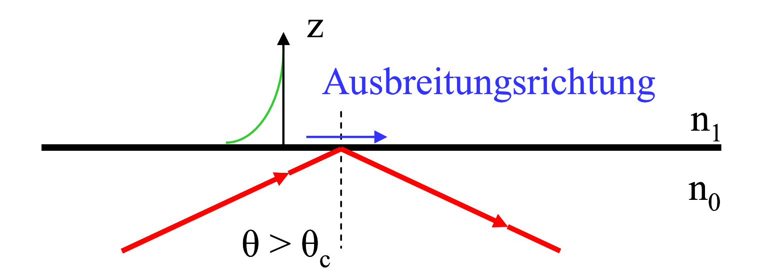


Abbildung 16: Schematische Darstellung der totalen Reflexion eines Lichtstrahls im Medium n_0. Die grün gezeichnete Exponentialkurve zeigt die hierbei entstehende evaneszente Welle an.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von MEGAP im Nervensystem

Im Rahmen molekulargenetischer Untersuchungen mental retardierter Patienten konnte *MEGAP* (*srGAP3*) als ein Kandidatengen für neuronale Entwicklung und damit verbundene kognitive Funktionen isoliert werden (Endris et al., 2002). Die Einbindung von MEGAP in die Slit/Robo-Signaltransduktion (Wong et al., 2001) deutet insbesondere auf eine Funktion bei der Wegfindung auswachsender Axone hin. Dieser Prozess ist eine wichtige Voraussetzung für die korrekte Vernetzung und Positionierung neuronaler Vorläuferzellen und Neuronen während der Entwicklung des Nervensystems. Daher sollte zunächst die Expression von MEGAP während der murinen Embryonalentwicklung und insbesondere des Nervensystems untersucht werden.

Aus früheren Studien war bereits bekannt, dass *Megap* in der Maus sehr stark im adulten Hippokampus inklusive des Gyrus Dentatus exprimiert ist. Zusätzlich konnte die Expression von *Megap* u. a. in der Amygdala, im Piriformen Kortex, im Bulbus olfaktorius sowie im Zerebellum nachgewiesen werden (Endris *et al.*, 2002; Lein *et al.*, 2007; Waltereit *et al.*, 2008a).

Die in dieser Arbeit durchgeführten RNA *in situ* Hybridisierungen zeigten auf, dass *Megap* bereits sehr früh während der murinen Embryonalentwicklung transkribiert wird. Im Embryonalstadium E9.5 p.c. konnte die Expression von *Megap* hauptsächlich im Neuroepithel des Neuralrohrs, in der ventrikulären Zone des Vorderhirns („telencephalic vesicle“) sowie in Bereichen des Hinterhirns detektiert werden (Abbildung 17).

Auch in späteren Entwicklungsstadien (E11.5 p.c. und E12.5 p.c.) wurde die *Megap*-mRNA in großen Teilen des sich entwickelnden Zentralnervensystems (ZNS) nachgewiesen. Regionen mit ausgeprägter *Megap*-Expression umfassen die ventrikulären und subventrikulären Zonen des Vorder-, Mittel- und Hinterhirns, das Neuroepithel des Neuralrohrs, die Hinterwurzelganglien sowie die trigeminalen und inferialen Ganglien (Abbildung 18). Insbesondere in den ventrikulären Zonen werden die neuronalen Vorläuferzellen geboren (Ayala *et al.*, 2007). Die starke Expression von *Megap* in einer Vielzahl neuronaler Vorläuferzellen deutet auf eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des ZNS hin. Weitere Daten zur Expression von *Megap* können über folgende Internetseiten eingeholt werden: www.brain-map.org/, www.ncbi.nlm.nih.gov./projects/gensat/, www.genepaint.org/.

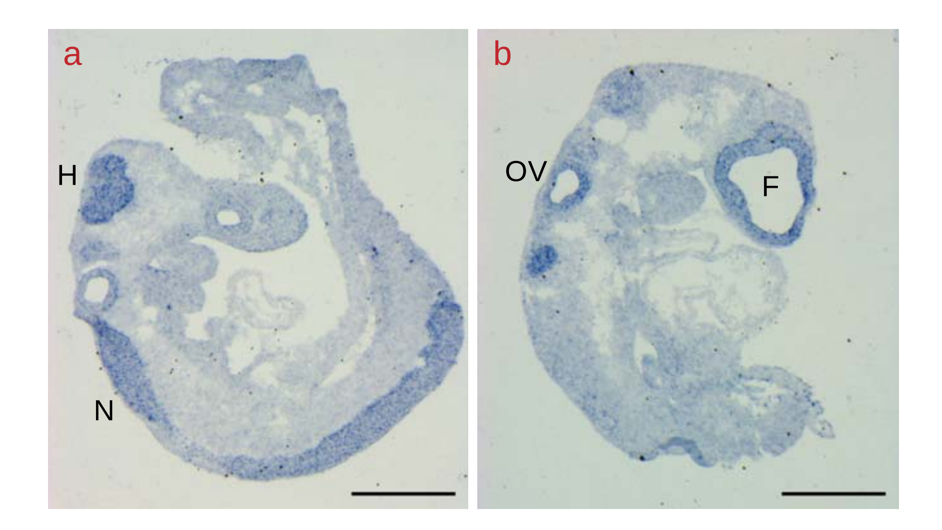


Abbildung 17: RNA *in situ* Hybridisierung mit einer *Megap* Sonde auf Sagittalschnitten eines Mausembryos im Entwicklungsstadium E9.5 p.c. Die Hybridisierung mit einer *Megap* anti-sense RNA-Sonde zeigt eine starke Expression von *Megap*: **a)** im Neuroepithel des Neuralrohrs (N) und im Hinterhirn (H), **b)** im Vorderhirn (F) und im otogenen Vesikel (OV). Die Maßstabsbalken entsprechen 500 µm.

Im Rahmen der Analyse des Expressionsmusters von *Megap* wurde zusätzlich die Expression des Slit-Rezeptors *Robo1* in den Embryonalstadien E11.5 p.c. und E12.5 p.c. untersucht. Hierbei wurden benachbarte Schnitte mit den Sonden für *Megap* bzw. *Robo1* hybridisiert, um die jeweiligen Expressionsmuster in Korrelation zu stellen. Unter der Annahme, dass MEGAP und Robo1 in einem gemeinsamen Signaltransduktionsweg eingebunden sind, sollte eine Überlappung der mRNA-Expression nachzuweisen sein. Dies konnte sowohl für E11.5 p.c. als auch für E12.5 p.c. in der Maus gezeigt werden (Abbildung 18). *Megap* und *Robo1* werden u. a. im Neuroepithel des Neuralrohrs und in Teilen des Vorder- und Mittelhirns co-exprimiert. Im Unterschied zur Expression von *Megap* konnte die *Robo1*-mRNA jedoch nicht in den ventrikulären Zonen des Vorder-, Mittel- und Hinterhirns (E11.5 und E12.5), in der Flurplatte (E11.5), den Hinterwurzelganglien (E11.5), im neuronalen Gewebe des Auges sowie in den trigeminalen und inferialen Ganglien (E11.5) detektiert werden. Aufgrund dieser Unterschiede und der sehr frühen Expression von MEGAP ist dessen Einbindung in einen oder mehrere, von Robo1 unabhängige, Signaltransduktionswege sehr wahrscheinlich.

Um die Spezifität der anti-sense RNA-Sonden für *Megap* und *Robo1* zu verifizieren, wurden jeweils RNA *in situ* Hybridisierungen mit den entsprechenden sense Sonden durchgeführt (vgl. Anhang 5.5).

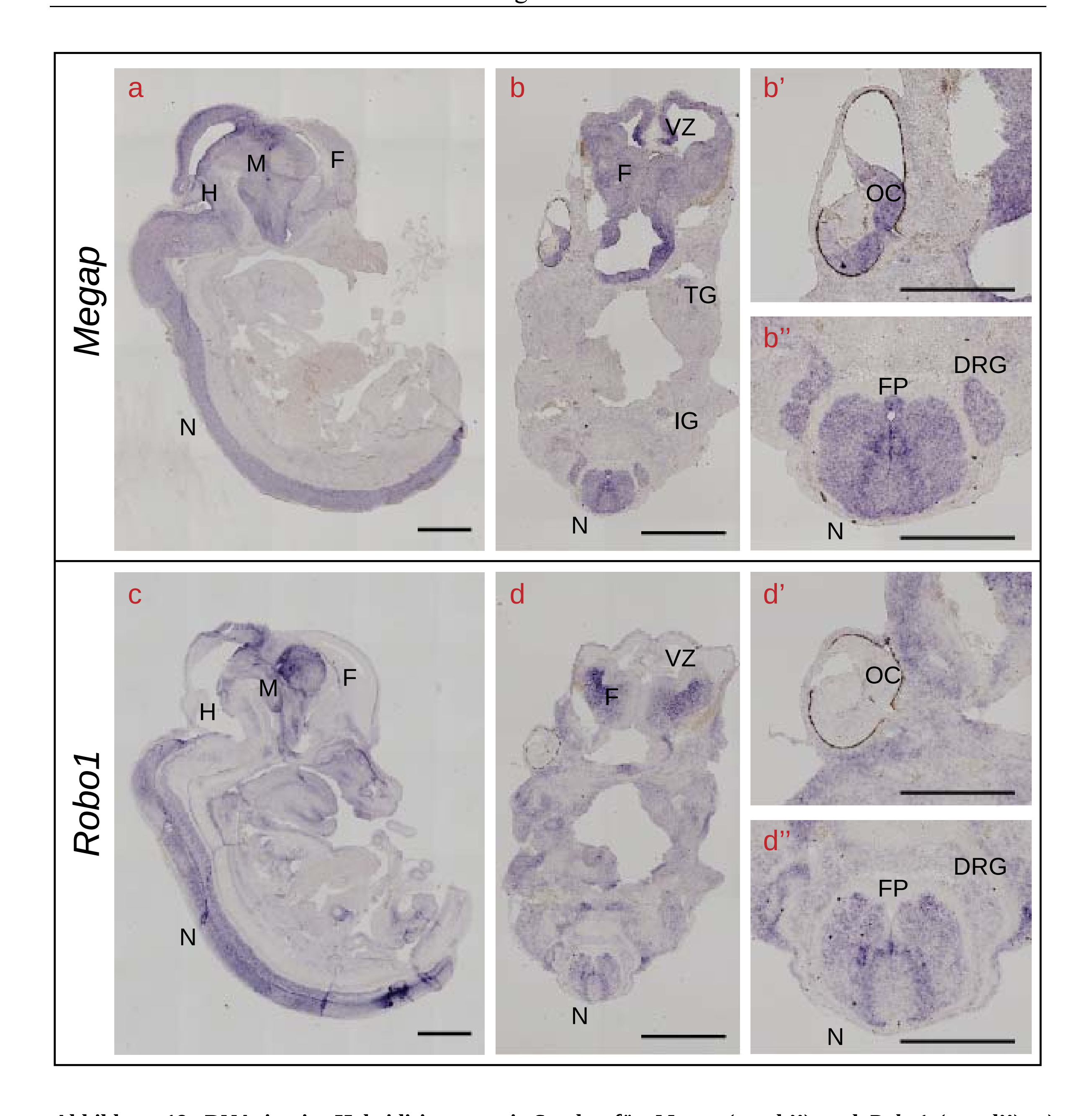


Abbildung 18: RNA *in situ* Hybridisierung mit Sonden für *Megap* (a – b'') und *Robo1* (c – d''). a) Hybridisierung einer *Megap* anti-sense RNA-Sonde auf einem medialen Sagittalschnitt, Embryonalstadium E12.5 p.c. Eine starke Expression von *Megap* ließ sich im Neuroepithel des Neuralrohrs (N) sowie in weiten Bereichen von Hinterhirn (H), Mittelhirn (M) und Vorderhirn (F) beobachten. **b) – b'')** *Megap* RNA *in situ* Hybridisierung auf einem Transversalschnitt, Embryonalstadium E11.5 p.c., **b')** und **b'')** zeigen Ausschnittsvergrößerungen des Auges (b') und des Neuralrohrs (b''). Expression von *Megap* konnte in den ventrikulären Zonen (VZ), im Vorderhirn (F), den trigeminalen (TG) und inferialen (IG) Ganglien, im Neuralrohr (N) inkl. der Flurplatte (FP), den Hinterwurzelganglien (DRG) sowie im neuronalen Gewebe des Auges (neural layer of optic cup – OC) detektiert werden. **c) – d'')** Hybridisierung mit einer *Robo1* anti-sense RNA-Sonde auf den entsprechenden Folgeschnitten der RNA *in situ* Hybridisierung für *Megap* (a → c; b → d) Co-Expression von *Megap* und *Robo1* konnte im Neuroepithel des Neuralrohrs sowie im Mittel- und Vorderhirn detektiert werden. Im Unterschied zu *Megap* wird *Robo1* nicht in den ventrikulären Zonen (VZ), den Hinterwurzelganglien (DRG), der Flurplatte (FP) und im neuronalen Gewebe des Auges exprimiert. Die Maßstabsbalken entsprechen in a), b), c) und d) 1000 µm; in b'), b'') sowie d') und d'') 500 µm.

3.2 Isolierung von MEGAP-Interaktionspartnern

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass MEGAP mit WAVE-1 (Soderling et al., 2002), Robo1 (Wong et al., 2001) und c-Abl (Endris *et al.*, 2009) interagiert. Diese Proteine sind an der Regulation des Zell-Zytoskeletts bzw. an der Slit/Robo Signaltransduktionskaskade beteiligt.
Um ein besseres Verständnis für die Rolle von MEGAP bezüglich neuronaler Entwicklungsprozesse zu erhalten, sollte im Rahmen dieser Arbeit nach bisher unbekannten MEGAP-Interaktionspartnern gesucht werden. Die Suche nach MEGAP-bindenden Proteinen erfolgte mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid Systems und mittels GST-Pulldown.

3.2.1 Yeast-Two-Hybrid Screen

Mit dem Yeast-Two-Hybrid System können cDNA-Bibliotheken gezielt nach bisher unbekannten Interaktionspartnern durchsucht werden. Aufgrund der Tatsache, dass die MEGAP-SH3 Domäne eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen MEGAP und WAVE-1 bzw. Robo1 einnimmt, wurden in dieser Arbeit ebenfalls MEGAP-SH3-bindende Proteine gesucht. Die MEGAP-SH3 Domäne befindet sich im C-terminalen Bereich von MEGAP (Abbildung 9). Da die Expression des gesamten Proteins aufgrund seiner Größe von 160 kDa in Hefen nicht möglich war, wurde nur ein C-terminales Fragment für den Yeast-Two-Hybrid Screen ausgewählt (MEGAP-C, Abbildung 13) und als „bait“ verwendet. Die Expression des Fusionsproteins aus der DNA-bindenden Domäne des Transkriptionsfaktors GAL4 (GAL4-DB) und MEGAP-C erfolgte über den Gateway Expressionsvektor pDEST32. Der Expressionsvektor pDEST22 diente zur Expression von Fusionsproteinen aus der GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4-AD) und bekannten Interaktionspartnern wie der CC3-Domäne von Robo1. Die für den Yeast-Two-Hybrid Screen verwendete cDNA-Bibliothek setzte sich ebenfalls aus Expressionsvektoren zusammen, welche die GAL4-AD und die in der Bibliothek enthaltenen Proteinfragmente exprimierten („prey“). Für die Isolation physiologisch relevanter Interaktionspartner im Rahmen des Yeast-Two-Hybrid Screens wurde eine humane fötale Gehirn cDNA-Bibliothek verwendet.
Der Ablauf eines Yeast-Two-Hybrid Screens setzt sich aus mehreren Schritten zusammen (Abbildung 19). Nach der Co-Transformation des „bait“ (pDEST32-*MEGAP-C*) und der cDNA-Bibliothek müssen die generierten Hefeklone auf Selektionsmedium wachsen. Nur

so konnte die Aktivierung von Reportergenen detektiert und die entsprechend positiven Klone selektiert werden. In dieser Arbeit wurde Histidin als primärer Selektionsmarker verwendet und die Hefeklone auf einem Selektionsmedium ohne Histidin inkubiert. Aufgrund einer restlichen Histidinsynthese im Hefestamm MaV203 wurde der Inhibitor 3-AT zu dem Selektionsmedium in entsprechend angepasster Konzentration zugefügt. Im Anschluss an die erste Selektion über das Wachstum auf –His Platten erfolgte die qualitative Bestimmung der Reporteraktivitäten des *URA3*- und des *lacZ*-Gens. Bei den Klonen, welche in diesem Prozess als positiv bewertet wurden, fand anschließend eine quantitative Analyse der *lacZ*-Reporteraktivität statt. Nach der Identifizierung der putativen Interaktionspartner wurden Kontrollexperimente durchgeführt, um die isolierten Kandidaten zu verifizieren.

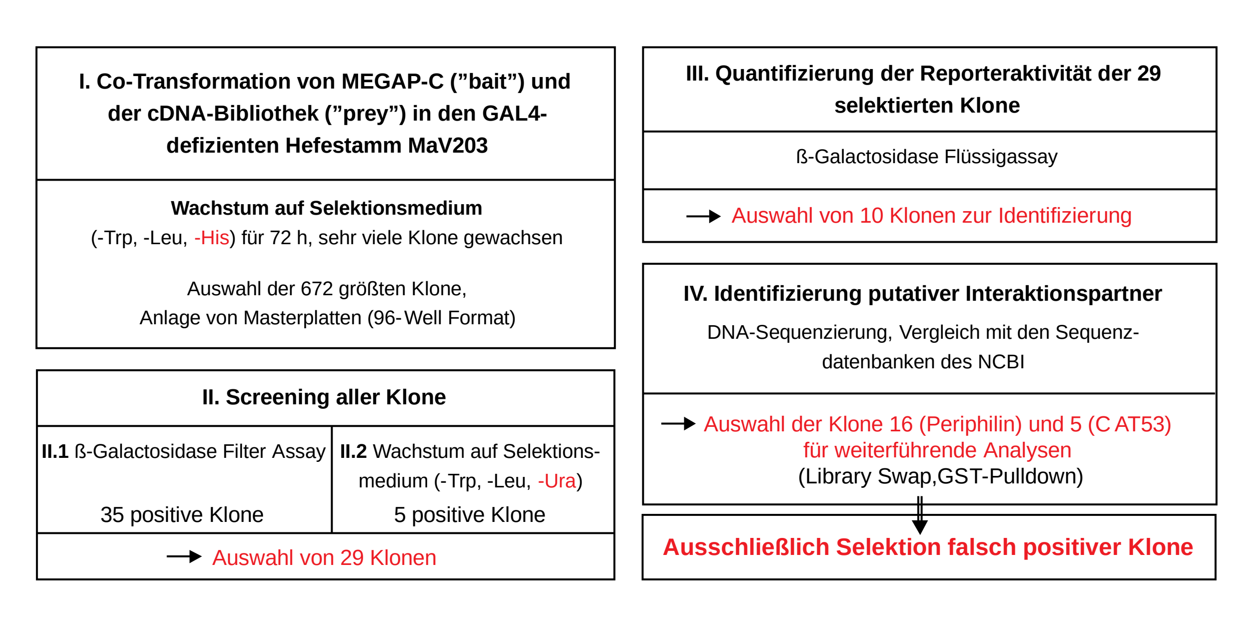


Abbildung 19: Ablaufschema des Yeast-Two-Hybrid Screens mit pDEST32-*MEGAP-C*

I. – Isolierung von Hefeklonen mit putativen MEGAP-Interaktionspartnern

Um sicher zu stellen, dass mit der Transformation der cDNA-Bibliothek die Anzahl der enthaltenen Klone abgedeckt wurde, erfolgte zunächst die Bestimmung der Transformationseffizienz bzw. die Anzahl der doppelt transformierten Hefeklone. Nur mit einer großen Anzahl an doppelt transformierten Klonen bestand die Wahrscheinlichkeit, dass auch cDNA-Klone mit geringer Kopienzahl erfasst werden konnten. Für den durchgeführten Yeast-Two-Hybrid Screen mit pDEST32-*MEGAP-C* und der humanen fötalen Gehirn cDNA-Bibliothek ergab sich eine Anzahl von 1.406 x 10^6 doppelt transformierten Klonen. Hierbei ist anzumerken, dass trotz der relativ hohen Konzentration

des Histidinsynthese-Inhibitors 3-AT sehr viele Klone gewachsen sind. Dies deutete auf eine größere Anzahl falsch positiver Klone hin. Daher wurden für die Generierung von Masterplatten 672 der größten gewachsenen Klone für eine weitere Analyse in sieben 96 Well Platten überführt. Nachträglich wurden noch zehn weitere große Klone von einer für 96 h bei 30°C inkubierten Platte ausgewählt (8.1 – 8.10 bzw. Nr. 20 – 29). Diese Klone wurden direkt mit Hilfe des ß-Galactosidase Flüssigassays bewertet.

II.1 - Durchführung des X-Gal-Filter-Assays

Nach einer Inkubation der angeimpften Masterplatten für 48 h bei 30°C wurden die Klone mit einem 96 Pin Replikator (Nalge Nunc) zur Durchführung eines X-Gal-Filter-Assays (Abschnitt 2.10.4.5) auf Hybond-NX-Nylonmembranen (auf -Leu-Trp-Agarplatten) überimpft. Nach zwei weiteren Tagen Wachstum wurde ein X-Gal-Filterassay durchgeführt.
Insgesamt zeigten 35 der 672 Hefeklone nach maximal 24 Stunden Inkubationszeit einen Farbumschlag nach blau, verfügten also über eine β-Galaktosidase-Aktivität. Dieses Enzym wird unter den Bedingungen eines Yeast-Two-Hybrid Screens nur dann gebildet, wenn eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen stattfindet oder eine Autoaktivierung erfolgt. Parallel zu den untersuchten Klonen wurden Positivkontrollen (Kontrollstämme B und C; pDEST32-*MEGAP-C* + pDEST22-*ROBO1-CC3*) sowie eine Negativkontrolle (pDEST32-*MEGAP-C* + pDEST22 leer) mitgeführt. Zur Verifizierung der Daten wurde der Filter-Assay mit allen Klonen zweimal wiederholt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

II.2 - Test auf Aktivierung des URA3-Gens

Zusätzlich zur qualitativen Analyse der Aktivität des *HIS3*-Reportergens wurde die Aktivierung des *URA3*-Gens untersucht. Nur bei einer Proteininteraktion wird das *URA3*-Gen exprimiert, welches der Hefezelle die Synthese der essentiellen Aminosäure Uracil (Ura) und somit das Wachstum auf Ura-defizienten Platten ermöglicht. Diese Selektionsmethode zeigte eine sehr starke Stringenz auf, da eindeutiges Wachstum nur bei 5 der im Filterassay als positiv getesteten Klone nachgewiesen werden konnte (Tabelle 9).

III – Quantifizierung der Reporteraktivität mittels ß-Galactosidase Flüssigassay

Ausgehend von den Ergebnissen des X-Gal-Filterassays sowie des Wachstumstests auf Ura-defizienten Platten wurden 29 Klone für eine Quantifizierung der ß-Galactosidaseaktivität ausgewählt (Abbildung 20; Tabelle 9). Die in diesem Experiment eindeutig positiv getesteten Klone wurden anschließend mittels DNA-Sequenzierung identifiziert.

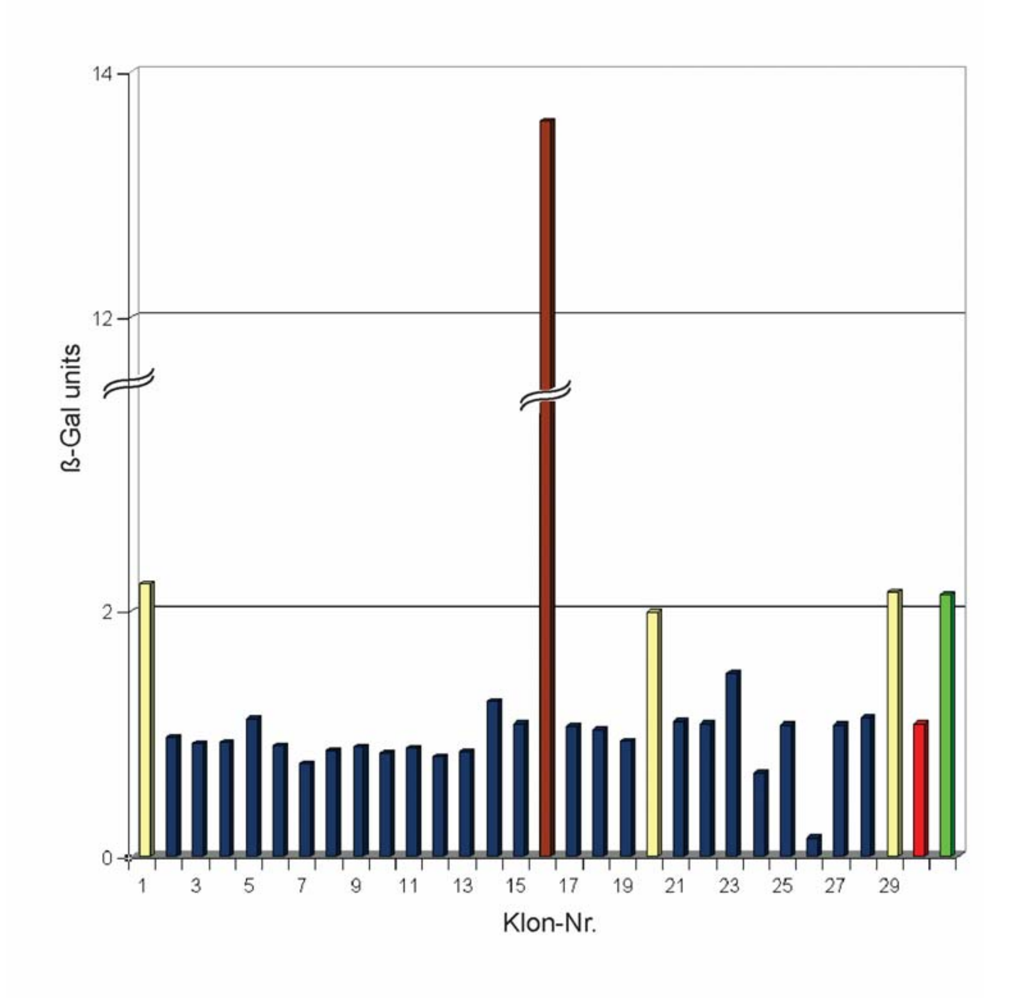


Abbildung 20: Darstellung der im ß-Galactosidase Flüssigassay getesteten Klone. Die Aktivität der ß-Galactosidase wurde in ß-Gal units angegeben (Abschnitt 2.10.4.4). Hervorgehoben sind die Negativkontrolle (rot; pDEST32-*MEGAP-C* + pDEST22 leer), die Positivkontrolle (grün; pDEST32-*MEGAP-C* + pDEST22-*ROBO1-CC3*) sowie die eindeutig positiv getesteten Klone Nr. 16 (braun); 1, 20 und 29 (gelb). Klon Nr. 16 zeigte in diesem Assay eine extrem starke Galactosidaseaktivität.

Originalname	Klon-Nr.	X-Gal-Filter-Assay	Wachstum auf -Leu-Trp-Ura	ß-Gal units (Flüssigassay)
I B10	**1**	**++**	**-**	**2.22**
I A10	2	+	-	0.97
I C10	3	+	-	0.92
I C11	4	+	-	0.93
I D11	5	+	-	1.12
I C12	6	+	-	0.9
I D12	7	(+)	-	0.75
VI C12	8	+	-	0.86
I G2	9	+	-	0.89
I E12	10	+	-	0.84
I G11	11	+	-	0.88
I G12	12	+	-	0.81
I H12	13	+	-	0.85
I H11	14	++	-	1.26
VI B11	15	++	+	1.08
VI B10	**16**	**+++**	**+++**	**13.6**
VI B12	17	(+)	(+)	1.06
VI A10	18	(+)	(+)	1.03
VII B11	19	+	(+)	0.94
8.1	20	n.d.	n.d.	1.99
8.2	21	n.d.	n.d.	1.1
8.3	22	n.d.	n.d.	1.08
8.4	**23**	**n.d.**	**n.d.**	**1.49**
8.5	24	n.d.	n.d.	0.68
8.6	25	n.d.	n.d.	1.07
8.7	26	n.d.	n.d.	0.15
8.8	27	n.d.	n.d.	1.07
8.9	28	n.d.	n.d.	1.13
8.10	**29**	**n.d.**	**n.d.**	**2.15**
I B11	30	+	-	n.d.
IV G1	31	(+)	-	n.d.
IV G2	32	(+)	-	n.d.
VII A9	33	(+)	-	n.d.
VII A10	34	(+)	-	n.d.
VII A11	35	(+)	-	n.d.
	Negativkontrolle	**-/(+)**	**-**	**1.08**
	Positivkontrolle	**++**	**+**	**2.13**

Tabelle 9: Gegenüberstellung der Ergebnisse aus der qualitativen (X-Gal-Filter-Assay, Wachstum auf -Leu-Trp-Ura) und quantitativen (ß-Galactosidase-Flüssigassay) Analyse der Reportergen-aktivität in den Hefeklonen. Klone, welche durchgängig negativ getestet wurden, sind nicht aufgeführt. Bei der qualitativen Analyse wurde die folgende Bewertung vorgenommen: **-** negativ; **(+)** sehr schwach, kaum detektierbar; + bis +++ positiv mit zunehmender Intensität; n.d. nicht determiniert. Der orange markierte Klon Nr. 16 zeigte in allen Experimenten herausragende Aktivierung der Reportergenaktivität. Ausgehend von den Werten der Positiv- und Negativkontrollen wurden Klon Nr. 16 und die gelb markierten Klone für eine weitere Analyse ausgewählt. Um eine allgemeine Aussage über die Qualität des Yeast-Two-Hybrid Screens treffen zu können, wurden auch einige Klone mit geringer Reporteraktivität einbezogen.

IV - Identifizierung der ausgewählten Hefeklone

Ausgehend von den Ergebnissen des ß-Galactosidase Flüssigassays wurde die Identität von 10 Hefeklonen mittels DNA-Sequenzierung und anschließendem Vergleich mit bekannten

Sequenzen der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) bestimmt (Tabelle 10). Hierbei muss jedoch angemerkt werden, dass nur die Klone 1, 16, 20 und 29 eine Aktivierung der Reportergene aufzeigten, welche sich deutlich von den Werten der Negativkontrolle abheben konnte.

Klon-Nr.	*Identität*	*Lokalisation*	*Leserahmen*
5	Homo sapiens protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 10, mRNA (CAT53 gene)	ORF	+
9	Homo sapiens internexin neuronal intermediate filament protein, alpha (INA)	3’UTR	n.d.
10	Homo sapiens internexin neuronal intermediate filament protein, alpha (INA)	3’UTR	n.d.
14	Homo sapiens ribosomal protein L23 (RPL23), mRNA	ORF	+
16	Homo sapiens periphilin 1 (PPHLN1), transcript variant 1, mRNA	ORF	+
20	Homo sapiens MARCKS-like 1 (MARCKSL1), mRNA	ORF	Verschiebung um eine Base, Generierung eines Stoppkodons
23	Homo sapiens PTK2 protein tyrosine kinase 2 (Focal adhesion kinase 1)	ORF	Verschiebung um eine Base, Generierung eines Stoppkodons
29	DPH3, KTI11 homolog (S. cerevisiae) [Homo sapiens]	ORF	Verschiebung um eine Base, Generierung eines Stoppkodons

Tabelle 10: Auflistung der im Rahmen des Yeast-Two-Hybrid Screens eindeutig identifizierbaren Hefeklone. Die Lokalisation gibt die Positionierung des sequenzierten cDNA-Fragments in Bezug auf den Leserahmen an. Die Sequenzen der cDNA-Klone, welche sich innerhalb des offenen Leserahmens (ORF) des jeweiligen Gens befanden, sind im Anhang aufgeführt (Abschnitt 5.4).

Bei der Auswahl putativer Interaktionspartner für weiterführende Analysen mussten mehrere Kriterien beachtet werden. Die erste wichtige Bedingung war die Aktivierung von Reportergenen im Rahmen des Yeast-Two-Hybrid Screens. Zusätzlich sollten die identifizierten Kandidaten in für MEGAP relevante Signaltransduktionswege eingebunden sein. In diesem Kontext wurden z. B. Proteine, welche in die Regulation des Zytoskeletts involviert sind, als besonders interessant erachtet.

Da sowohl mitochondriale als auch ribosomale Proteine häufig als falsch-positive Interaktionspartner bei Yeast-Two-Hybrid Screens identifiziert werden (Hengen, 1997; Van Criekinge and Beyaert, 1999), wurde Klon 14 nicht weiter berücksichtigt. Klone Nr. 9 und 10 wurden ebenfalls als negative Ergebnisse aussortiert, da sie eine sehr geringe Reporteraktivierung aufwiesen und die Sequenz der enthaltenen cDNA-Fragmente außerhalb des Leserahmens für das Protein INA lokalisiert war.

Die Sequenz von Klon Nr. 23 konnte mit einer sehr hohen Übereinstimmung der Focal adhesion Kinase1 (FAK) zugeordnet werden. Dieses Protein spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation des Zytoskeletts an der Zellmembran. Allerdings musste bei der Sequenzanalyse nicht nur die Identität des jeweiligen Klons sondern auch dessen korrekter Leserahmen bestätigt werden. Bei Klon Nr. 23 wurde eine Verschiebung des Leserasters um eine Base detektiert. Daher konnte auch die FAK nicht mehr als putativer Interaktionspartner gewertet werden. Eine ähnliche Situation lag bei den Klonen Nr. 20 und 29 vor. Da in diesen Klonen direkt nach der Vektorsequenz ein Stoppkodon folgte, war die Expression eines Fusionsproteins mit der GAL4-Aktivierungsdomäne und dem putativen Interaktionspartner MARCKS-like 1 bzw. DPH3 auszuschließen. Deshalb mussten auch Klon Nr. 20 und 29 als falsch-positive Kandidaten aussortiert werden. Somit konnten letztlich nur die Klone Nr. 5 (CAT53) und 16 (Periphilin) für den „Library Swap“ (Abschnitt 3.2.1.1) und daran anschließende Untersuchungen ausgewählt werden.

3.2.1.1 „Library Swap“ der putativen Interaktionspartner

Um sicherzustellen, dass es sich bei den putativen Interaktionspartnern von MEGAP nicht um falsch-positive Ergebnisse handelt, wurde ein „Library Swap” durchgeführt. Dieser basiert auf dem Grundsatz, dass es bei zwei im Yeast-Two-Hybrid System interagierenden Proteinen irrelevant ist, welches der beiden Proteine als „bait“ oder „prey“ fungiert (vgl.2.10.4). Hierzu wurden die für die putativen Interaktionspartner kodierenden cDNAs aus pEXP-AD22 in den pDEST32-Vektor kloniert. Dem entsprechend wurde das *MEGAP-C* Fragment in den pDEST22-Vektor kloniert. Anschließend wurden die generierten Expressionskonstrukte in den Hefestamm MaV203™ transformiert (Transformations-kombinationen siehe Tabelle 11) und die vorhandene ß-Galactosidaseaktivität quantifiziert (Abbildung 21). Zur Verifizierung der Daten wurden für jeden doppelt transformierten Hefeklon drei voneinander unabhängige Werte ermittelt. Die Mittelwerte sind in Tabelle 11 aufgeführt, wobei das Expressionskonstrukt pDEST32-*CAT53* eine sehr starke Autoaktivierung zeigte. Aufgrund der großen Diskrepanz zwischen den Werten aus dem ersten ß-Gal Flüssigassay und dem „Library Swap“, wurde CAT53 als falsch positiver Klon eingeordnet. Auch bei *Periphilin* konnte eine leichte Autoaktivierung des ß-Gal Reporters festgestellt werden, welche allerdings durch die Co-Transformation mit den Expressionskonstrukten für *MEGAP-C* deutlich gesteigert wurde.

Als Endresultat des Yeast-Two-Hybrid Screens konnte somit genau ein Protein, Periphilin, als putativer Interaktionspartner für MEGAP selektiert werden. Dies sollte anschließend mittels GST-Pulldown bestätigt werden.

Klon	*Konstruktkombination*	*ß-Gal units (Flüssigassay)*
L1	pEXP-AD22_*Periphilin* + pDEST32 leer	1.31
L2	pEXP-AD22_*Periphilin* + pDEST32_*MEGAP-C*	11.34
L3	pDEST32_*Periphilin* + pDEST22 leer	2.3
L4	pDEST32_*Periphilin* + pDEST22_*MEGAP-C*	4.1
L5	pEXP-AD22_*CAT53* + pDEST32 leer	0.52
L6	pEXP-AD22_*CAT53* + pDEST32_*MEGAP-C*	0.57
L7	**pDEST32_*CAT53*** + pDEST22 leer	**145**
L8	**pDEST32_*CAT53*** + pDEST22_*MEGAP-C*	**165**
L9	pDEST32_*MEGAP-C* + pDEST22 leer	0.54
L10	pDEST32_*MEGAP-C* + pDEST22-*ROBO1-CC3*	0.86

Tabelle 11: Auflistung der im „Library Swap“ verwendeten Konstruktkombinationen und der zugehörigen ß-Galactosidaseaktivitäten. L9: Negativkontrolle, L10: Positiv-kontrolle. Die Werte der ß-Gal units zeigten eine starke Autoaktivierung für pDEST32_CAT53 an, welches daher nicht weiter analysiert werden konnte.

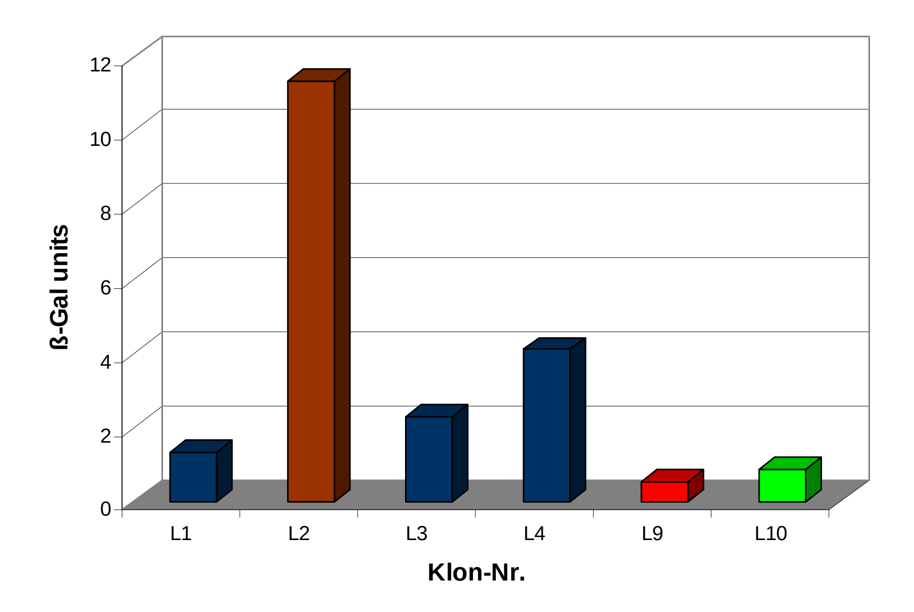


Abbildung 21: „Library Swap“ mit Klon Nr. 16 bzw. *Periphilin* und *MEGAP-C*. Details bezüglich der Klonbezeichnungen sind Tabelle 11 zu entnehmen. Die Negativkontrollen für Periphilin (L1 und L3) zeigten eine leichte Autoaktivierung, dennoch konnte durch Co-Transformation mit *MEGAP-C* die Reporteraktivität deutlich gesteigert werden.

3.2.2 GST-Pulldown mit der MEGAP-SH3 Domäne

3.2.2.1 Isolierung putativer Interaktionspartner aus eukaryontischen Zell- und Gewebeextrakten

Neben dem Yeast-Two-Hybrid Screen wurden für die Suche nach bisher unbekannten MEGAP-Interaktionspartnern in dieser Arbeit GST-Pulldown Experimente durchgeführt. Wie beim Yeast-Two-Hybrid Screen wurde die MEGAP-SH3 Domäne als „bait“ eingesetzt, kloniert als Fusionsprotein mit der Glutathione-S-Transferase (GST). Das GST-MEGAP-SH3 Fusionsprotein wurde mittels Glutathione-Affinitätschromatographie aufgereinigt und liegt gekoppelt an Glutathione-Sepharose-Kügelchen vor.
Zunächst wurde die GST-fusionierte MEGAP-SH3 Domäne mit einem Zellextrakt aus HEK293 Zellen inkubiert (Abbildung 22A), wobei GST allein und ein Ansatz ohne Zelllysat als Negativkontrollen mitgeführt wurden. Nach dem Pulldown und einer Auftrennung der Präzipitate mittels SDS-PAGE wurden diejenigen Proteinbanden ausgeschnitten, welche nur im Ansatz mit der MEGAP-SH3 Domäne detektiert werden konnten. Im Anschluss daran wurden die isolierten Proteine einem Trypsinverdau unterzogen und die generierten Peptide mittels Massenspektrometrie analysiert. Hierbei konnten Lamellipodin und Diaphanous homolog 1 als interessante Kandidaten identifiziert werden. Beide Proteine sind wie MEGAP an der Regulation des Aktinzytoskeletts beteiligt.

Die Zelllinie HEK293 wurde aus humanen fötalen Nierenzellen etabliert, in denen MEGAP endogen nur gering exprimiert wird. Daher wurde ein zweites GST-Pulldown-Experiment mit dem Lysat von adultem Mausgehirn durchgeführt (Abbildung 22B). Mit diesem Ansatz sollten MEGAP-Interaktionspartner identifiziert werden, welche in Gehirn-spezifische Signaltransduktionswege eingebunden sind. Interessanterweise wurde Lamellipodin erneut zusammen mit der MEGAP-SH3 Domäne präzipitiert. Zusätzlich konnten durch den GST-Pulldown mit adultem Mausgehirn Komponenten des WAVE-1 Komplexes präzipitiert werden (3*, 4* und 5* in Abbildung 22B), dessen Interaktion mit MEGAP bereits bekannt war (Soderling et al., 2002). Der putative Interaktionspartner Diaphanous 1 konnte hier nicht erfasst werden.

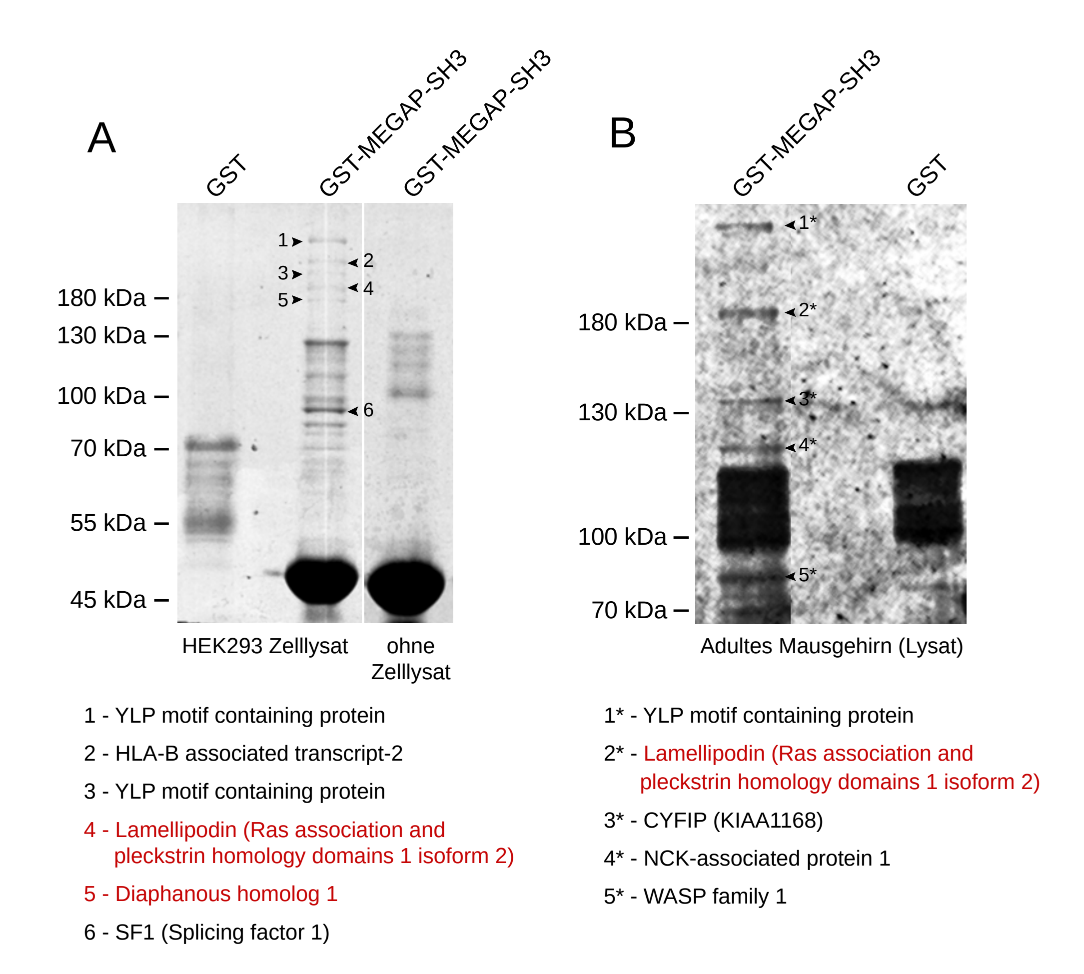


Abbildung 22: GST-Pulldown mit der MEGAP-SH3 Domäne und Zelllysaten von HEK293 Zellen (A) bzw. adultem Mausgehirn (B). Die rot markierten Proteine wurden als putative MEGAP-Interaktionspartner selektiert. Die detaillierten Ergebnisse der Massenspektrometrie-Analyse des GST-Pulldowns mit adultem Mausgehirn sind im Anhang aufgeführt (Abschnitt 5.6). Im Rahmen der Analyse der Proteinbanden mittels Massenspektrometrie konnte für Lamellipodin eine Phosphorylierung am Aminosäurerest S899 detektiert werden.

3.2.2.2 Verifizierung der putativen Interaktionspartner (Yeast-Two-Hybrid Screen und GST-Pulldown mit Zelllysaten)

Basierend auf den Ergebnissen der primären GST-Pulldown Experimente und des Yeast-Two-Hybrid Screens wurden Diaphanous homolog 1 (mDia1), Lamellipodin (Lpd) und Periphilin als Kandidaten für weitere Analysen ausgewählt. Aufgrund der Beteiligung an der Regulation von Aktin-Dynamiken stellten mDia1 und Lpd besonders interessante Kandidaten dar. Die Proteine SF1 (Splicing factor 1) und YLP (ZAP3) wurden nicht einbezogen, da sowohl ihre Lokalisation als auch ihre Funktionen auf den Zellkern konzentriert sind (Kramer, 1992; Armstrong *et al.*, 2004; Ulke-Lemee *et al.*, 2007). Zunächst sollte die Interaktion zwischen der MEGAP-SH3 Domäne und den putativen

Interaktionspartnern *in vitro* bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurden Lpd, mDia1 und Periphilin jeweils in einen Myc-Tag Expressionsvektor kloniert. Myc-Robo1 wurde als Positivkontrolle verwendet. Die generierten Expressionskonstrukte wurden in HEK293 Zellen transfiziert. Anschließend wurden mit den Zelllysaten und GST-MEGAP-SH3 bzw. GST allein erneut Pulldown Experimente durchgeführt (Abbildung 23). Sowohl Myc-Lpd als auch Myc-mDia1 und die Positivkontrolle Myc-Robo1 konnten zusammen mit der MEGAP-SH3 Domäne präzipitiert werden. Mit GST allein erfolgte keine Interaktion. Im Gegensatz dazu konnte bei Myc-Periphilin keine Interaktion mit der MEGAP-SH3 Domäne nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Daher wurde Periphilin in weiteren Studien nicht berücksichtigt.

Anhand der GST-Pulldown Studien konnte somit die Bindung zwischen der MEGAP-SH3 Domäne und Lpd bzw. mDia1 *in vitro* belegt werden. Dieser Ansatz gibt allerdings keine Auskunft darüber, ob die jeweiligen Proteine auch unter physiologischen Bedingungen bzw. unter Co-Expression im gleichen Zellkompartiment Komplexe bilden. Diese Fragestellung kann mit Hilfe der Co-Immunpräzipitation (Co-IP) untersucht werden.

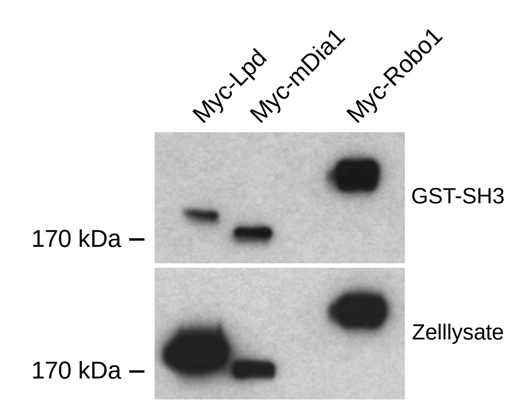


Abbildung 23: GST-Pulldown mit der MEGAP-SH3 Domäne und HEK293 Zelllysaten, transfiziert mit Myc-Lpd, Myc-mDia1 bzw. Myc-Robo1. Sowohl bei Myc-Lpd als auch Myc-mDia1 konnte eine Interaktion mit der MEGAP-SH3 beobachtet werden.

3.3 MEGAP interagiert mit dem Ena/VASP bindenden Protein Lamellipodin (Lpd)

Für die Co-IP Studien wurden Myc-Tag Expressionskonstrukte für Lpd und mDia1 zusammen mit MEGAP-Expressionskonstrukten zunächst in HEK293 Zellen transient co-transfiziert. Die Präzipitation der Immunkomplexe mit einem Myc-spezifischen Antikörper bestätigte die Bindung von Wildtyp MEGAP und Myc-Lpd (Abbildung 24A). Als

Spezifitätskontrollen wurden in der Co-IP die MEGAP-Mutanten W781A (Soderling *et al.*, 2002) und Y755D (Endris *et al.*, 2009) eingesetzt, welche keine funktionelle SH3-Domäne besitzen. Im Gegensatz zu Wildtyp MEGAP zeigten beide SH3-Mutanten keine Interaktion mit Myc-Lpd. Dies ist ein wichtiger Hinweis auf die Bedeutung der SH3-Domäne für die Interaktion zwischen MEGAP und Lpd. Um zu zeigen, dass die beiden Proteine nicht nur unter Überexpression in einer Zelllinie sondern auch unter physiologischen Bedingungen Komplexe bilden, wurde eine weitere Co-IP mit embryonalen Kortexneuronen der Ratte durchgeführt (Abbildung 24B). Mit Hilfe eines Lpd-spezifischen Antikörpers konnten hier sowohl endogen exprimiertes Lpd als auch MEGAP präzipitiert werden. Dies ist eine Bestätigung für die Interaktion zwischen MEGAP und Lpd *in vivo*.

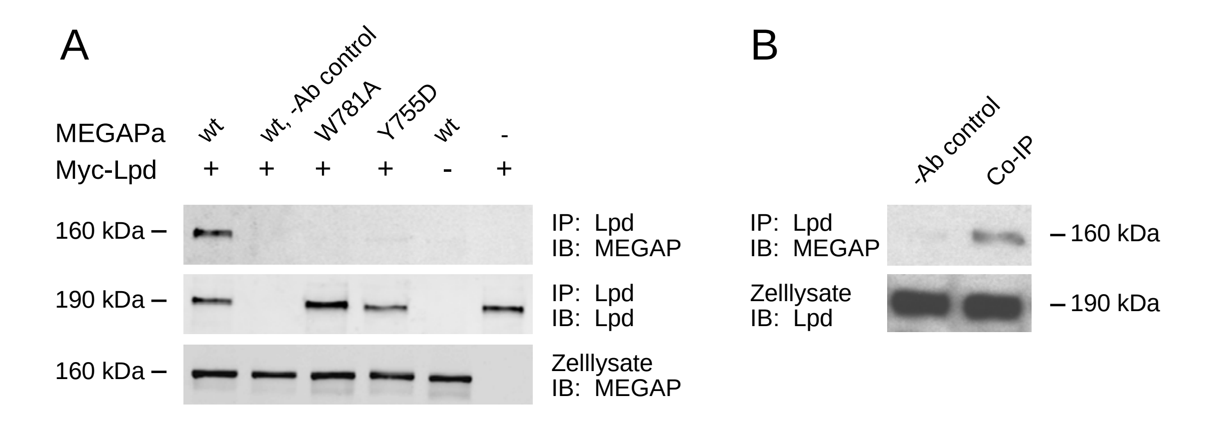


Abbildung 24: *In vitro* und *in vivo* Bindung von MEGAP und Lpd. (A) HEK293 Zellen wurden mit Myc-Lpd und MEGAP Expressionskonstrukten transient co-transfiziert. Die Immunpräzipitation erfolgte ca. 24 h nach der Transfektion mit einem monoklonalen Myc-Tag Antikörper. Die Präzipitate wurden mittels Immunoblot analysiert (obere Reihe: MEGAP; mittlere Reihe: Myc-Lpd). Die Co-IP zeigt, dass nur Wildtyp MEGAP (wt) an Myc-Lpd bindet. Mit den beiden MEGAP-SH3 Mutanten W781A und Y755D konnte keine Interaktion mit Myc-Lpd beobachtet werden. Die Kontrollansätze ohne Antikörper (-Ab control) und die Einzeltransfektionen zeigten keine unspezifischen Präzipitate auf. **(B)** Zelllysate von embryonalen kortikalen Neuronen der Ratte (Primärkultur) wurden für eine Co-IP mit einem Lpd-spezifischen Antikörper eingesetzt. Die Analyse der Präzipitate mit einem MEGAP-spezifischen Antikörper weist darauf hin, das die Interaktion zwischen MEGAP und Lpd auch *in vivo* und in einem neuronalen Kontext stattfindet. (Haussmann *et al.*, 2009)

Im Unterschied zur Analyse der Interaktion zwischen MEGAP und Lpd konnten für mDia1 keine konsistenten Ergebnisse produziert werden. Entweder wurde nur eine sehr schwache oder teilweise auch gar keine Bindung von MEGAP an mDia1 detektiert (nicht gezeigt). Dies kann darin begründet sein, dass mDia1 in einem bestimmten Aktivitätsstatus vorliegen muss, damit die Interaktion zu MEGAP stattfinden kann. Da sich die Interaktion zwischen MEGAP und mDia1 nicht bestätigen ließ, wurde bei der funktionellen Analyse der Protein-Protein Interaktionen der Fokus auf die Rolle der Bindung von MEGAP an Lpd gerichtet.

3.4 MEGAP und Lamellipodin werden teilweise co-exprimiert

Mit Hilfe der Co-IP konnte belegt werden, dass MEGAP und Lpd *in vivo* und besonders in Neuronen Komplexe bilden. Demnach sollte das Expressionsmuster beider Proteine in distinkten neuronalen Strukturen überlappen. Da der in dieser Arbeit verwendete MEGAP-Antikörper nur im Western Blot eine ausreichend hohe Spezifität aufwies, wurde die Expression von *Lpd* im Vergleich zu *Megap* in Zusammenarbeit mit Dr. Claire Bacon mittels RNA *in situ* Hybridisierung analysiert (Abbildung 25).

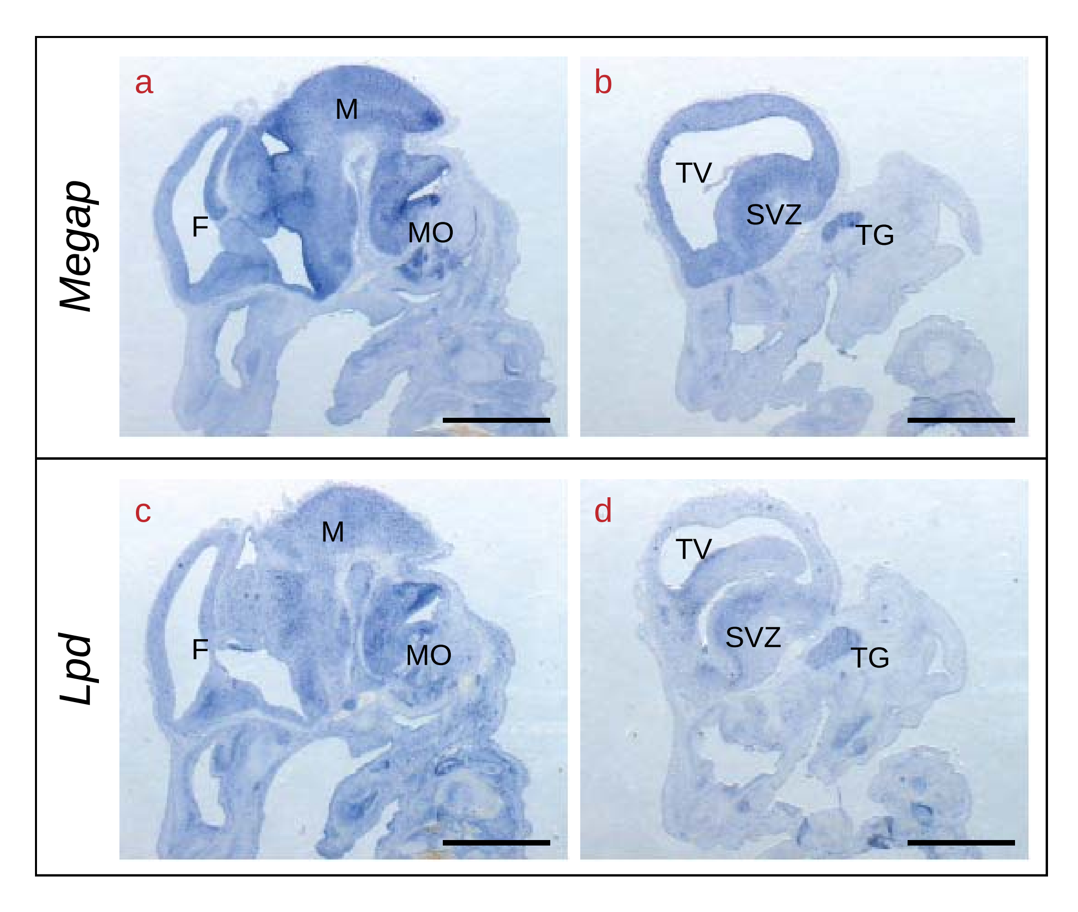


Abbildung 25: RNA *in situ* Hybridisierung mit Sonden für *Megap* (a, b) und *Lpd* (c, d). **a) + b)** Hybridisierung einer *Megap* anti-sense RNA-Sonde auf einem medialen (a) und lateralen (b) Sagittalschnitt, Ausschnitt Kopf; Embryonalstadium E11.5 p.c. Wie bereits in Abbildung 18 dargestellt, konnte eine starke Expression von *Megap* in weiten Bereichen des sich entwickelnden Gehirns beobachtet werden **c) + d)** Hybridisierung mit einer *Lpd* anti-sense RNA-Sonde auf den entsprechenden Folgeschnitten der RNA *in situ* Hybridisierung für *Megap* (a → c; b → d). Co-Expression von *Megap* und *Lpd* ließ sich in Bereichen des Mittelhirns (M), der Medulla Oblongata (MO), der subventrikulären Zone (SVZ) des Vorderhirns (telencephalic vesicle, TV) sowie im Ganglion trigeminale (TG) detektieren. Die Maßstabsbalken in a) bis d) entsprechen 1000 µm. (Negativkontrolle mit den sense-Sonden gegen *Megap* und *Lpd*, siehe Anhang 5.5). (Bacon und Haussmann, unveröffentlichte Daten)

Im Gegensatz zu *Megap* zeigte *Lpd* ein deutlich niedrigeres Expressionsniveau im sich entwickelnden ZNS. Dennoch konnten im Vergleich zur Hybridisierung mit der anti-sense Sonde gegen *Megap* Regionen überlappender Expressionsmuster identifiziert werden. Insbesondere die subventrikuläre Zone (SVZ) des Vorderhirns, die Medulla Oblongata sowie das Ganglion trigeminale (TG) präsentierten eindeutige Co-Expression von *Lpd* und *Megap*. Des Weiteren wurde überlappende Expression der mRNA in Bereichen des Mittel- (M) und Vorderhirns (F) detektiert. Mit Hilfe der RNA *in situ* Hybridisierung wurde somit gezeigt, dass *Megap* und *Lpd* während der Embryogenese in der Maus in bestimmten Bereichen und zu bestimmten Zeitpunkten co-exprimiert werden.

3.5 MEGAP co-lokalisiert mit Lamellipodin in NIH-3T3 Zellen

Im Anschluss an die Analyse der mRNA Expression wurde untersucht, ob MEGAP und Lpd an ähnlichen zellulären Strukturen detektiert werden können. Zu diesem Zweck wurden MEGAP-EYFP und mCherry-Lpd Fusionsproteine in NIH-3T3 Zellen co-exprimiert. Mit Hilfe von Epifluoreszenzaufnahmen konnte eine überlappende Proteinlokalisation von MEGAP und Lpd aufgezeigt werden. Abgesehen von der Detektion im Zytoplasma wurde eine spezifische Co-Lokalisation beider Proteine an der Zellmembran beobachtet (Abbildung 26).

Aufgrund der Tatsache, dass MEGAP-exprimierende Zellen eine verringerte Adhäsion an die Oberfläche der Zellkulturschalen aufwiesen, wurden die NIH-3T3 Zellen jeweils auf Fibronektin-beschichtete Deckgläser ausgesät. Insbesondere bei dem Wachstum auf einer Fibronektin-beschichteten Oberfläche in Kombination mit Serum-Reduktion zeigte MEGAP eine starke Lokalisierung an die Zellmembran. Dies könnte darauf hinweisen, dass MEGAP eventuell über Integrin-vermittelte Signalwege an die Membran rekrutiert wird.

Analog zu den Effekten von MEGAP in SHSY-5Y Neuroblastoma Zellen (Yang et al., 2006) zeigten MEGAP exprimierende NIH-3T3 Zellen unter Serum-Reduktion und anschließender Stimulierung durch einen Wachstumsfaktor keine Membranfortsätze bzw. Lamellipodien. Dieser Effekt wird durch die GTPase aktivierende Funktion von MEGAP auf Rac1 und die daraus resultierende Hemmung der Aktinpolymerisation gefördert (Endris et al., 2002; Soderling et al., 2002). Um die Proteinlokalisation von MEGAP und Lpd an der Migrationsfront und an benachbarten zellulären Strukturen zu untersuchen, wurde zusätzlich die GAP-defiziente MEGAP-Mutante MEGAP-RI (R542I) verwendet, welche keinen störenden Einfluss auf das Aktinzytoskelett ausübt (Yang et al., 2006).

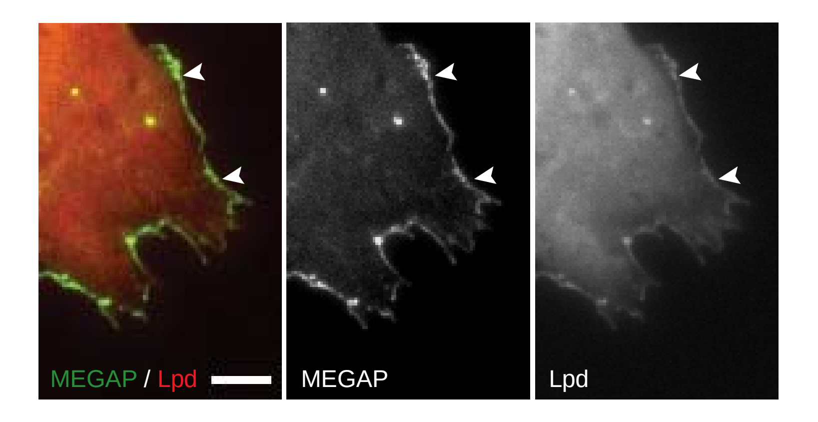


Abbildung 26: Epifluoreszenzaufnahmen von NIH-3T3 Zellen (unter Serum-reduzierten Bedingungen) ausgesät auf Fibronektin und transient transfiziert mit mCherry-Lpd und MEGAP-EYFP Expressionskonstrukten. MEGAP, und im geringeren Ausmaß auch Lpd, zeigten eine deutliche Lokalisation an der Zellmembran. Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm.

Aus früheren Studien ist bekannt, dass Lpd mit den Mitgliedern der Aktin-assoziierten Ena/VASP Proteinfamilie interagiert und in die Regulation von Lamellipodien-Dynamiken eingebunden ist (Krause et al., 2004). Um die Lokalisation von MEGAP und Lpd gezielt an den Strukturen von Zellfortsätzen und an der Migrationsfront von Lamellipodien zu untersuchen, wurde die TIRF-Mikroskopie eingesetzt (vgl. Abschnitt 2.16). Dies ermöglichte die hoch aufgelöste Visualisierung von Adhäsionsstrukturen und der Zellmembran in unmittelbarer Nähe des Deckglasbodens. Die TIRF-Aufnahmen von Wildtyp MEGAP-EYFP und mCherry-Lpd co-transfizierten NIH-3T3 Zellen zeigten eine Co-Lokalisation beider Proteine an distinkten Strukturen in der Nähe der Zellmembran (Abbildung 27A). Die Co-Expression von Lpd und der GAP-Mutante MEGAP-RI zeigte ebenfalls eine Co-Lokalisation der beiden Proteine, welche besonders an faserartigen, adhäsionsähnlichen Strukturen innerhalb der Lamella detektiert werden konnte. Jedoch co-lokalisierte Lpd nicht sehr stark mit MEGAP-RI an der Migrationsfront von Zellfortsätzen (Abbildung 27B).

Wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, vermittelt die MEGAP-SH3 Domäne die Interaktion zwischen MEGAP und Lpd. Im Rahmen der Co-Lokalisationsstudien sollte nun untersucht werden, ob die MEGAP-SH3 Domäne auch die Lokalisation von MEGAP und Lpd beeinflusst. Hier konnte gezeigt werden, dass der Funktionsverlust der SH3-Domäne in der Mutante Y755D sowohl die Co-Lokalisation zwischen MEGAP und Lpd als auch deren Lokalisation an spezifische zelluläre Strukturen aufhebt (Abbildung 27C).

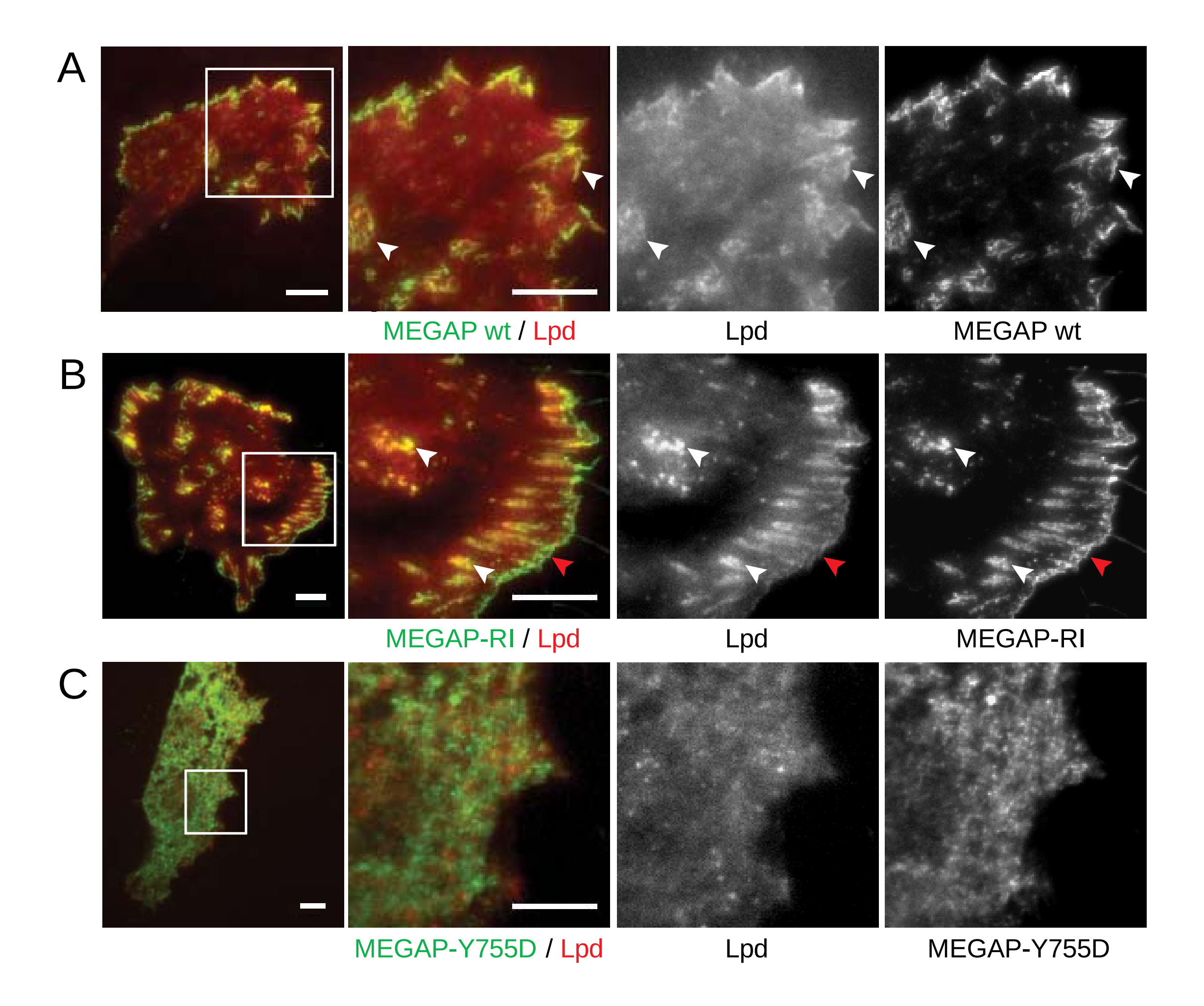


Abbildung 27: MEGAP co-lokalisiert mit Lpd in NIH-3T3 Zellen. (A) – (C) TIRF-Aufnahmen von NIH-3T3 Zellen unter Serum-Reduktion und Co-Expression von MEGAP und Lpd. **(A) + (B)** NIH-3T3 Zellen wurden mit mCherry-Lpd und Wildtyp (A) bzw. GAP-defizientem R542I (B) MEGAP-EYFP Expressionskonstrukten co-transfiziert. Sowohl der Wildtyp als auch die GAP-Mutante MEGAP-RI co-lokalisierten mit Lpd an spezifischen zellulären Strukturen (markiert durch weiße Pfeile). Im Gegensatz zu Lpd wurde MEGAP-RI auch an der Migrationsfront eines kleinen Membranfortsatzes detektiert (roter Pfeil). **(C)** Co-Transfektion von EYFP-markiertem MEGAP-Y755D (SH3-Mutante, welche nicht an Lpd bindet) und mCherry-Lpd. Weder die Co-Lokalisation zwischen MEGAP-Y755D und Lpd noch an distinkte zelluläre Strukturen konnte beobachtet werden. Die Maßstabsbalken in (A) bis (C) entsprechen 10 µm.

3.6 MEGAP hemmt die Dynamik von Lamellipodien

MEGAP inhibiert die Polymerisation von verzweigtem Aktin indem es die GTPase-Aktivität von Rac1 erhöht (Endris et al., 2002) und somit die Aktivierung des WAVE-1 Komplexes unterbindet (Soderling et al., 2002). Im Gegensatz dazu kann Lpd die Dynamik von Lamellipodien über die Beeinflussung des F-Aktingehaltes in der Nähe der Migrationsfront steigern (Krause et al., 2004). Die Co-Lokalisation von MEGAP und Lpd an Strukturen in der Nähe der Zellmembran wies auf die Einbindung beider Proteine in

einen gemeinsamen Signaltransduktionsweg für die Regulation des Aktinzytoskeletts hin. Demnach sollten nun Aspekte der Lamellipodienbildung untersucht werden, welche in Zusammenhang mit der Interaktion zwischen MEGAP und Lpd stehen. Zu diesem Zweck wurde der Wachstumsfaktor PDGF („platelet-derived growth factor“) eingesetzt, durch dessen Stimulierung in NIH-3T3 Zellen gezielt Lamellipodien induziert werden können (Yu *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2008).

NIH-3T3 Zellen, welche Wildtyp MEGAP überexprimierten, bildeten nach der Stimulierung durch PDGF kaum Lamellipodien oder kleinere Zellfortsätze aus (Abbildung 28A). Im Unterschied dazu reagierten Zellen unter Überexpression der GAP-defizienten Mutante MEGAP-RI auf die Behandlung durch PDGF mit ausgeprägter Lamellipodienbildung (Abbildung 28B). Diese Beobachtung ist mit der Tatsache vereinbar, dass MEGAP-RI, im Unterschied zum Wildtyp, die Zellmotilität nicht einschränkt (Yang et al., 2006). Durch die Einbeziehung von MEGAP-RI konnte hier gezeigt werden, dass die Unterdrückung von PDGF-induzierten Lamellipodien hauptsächlich durch die GTPase-aktivierende Funktion der GAP-Domäne verursacht wird. Um GAP-unabhängige Effekte von MEGAP auf Lpd zu untersuchen wurde die Mutante MEGAP-RI in weiterführende Studien einbezogen.

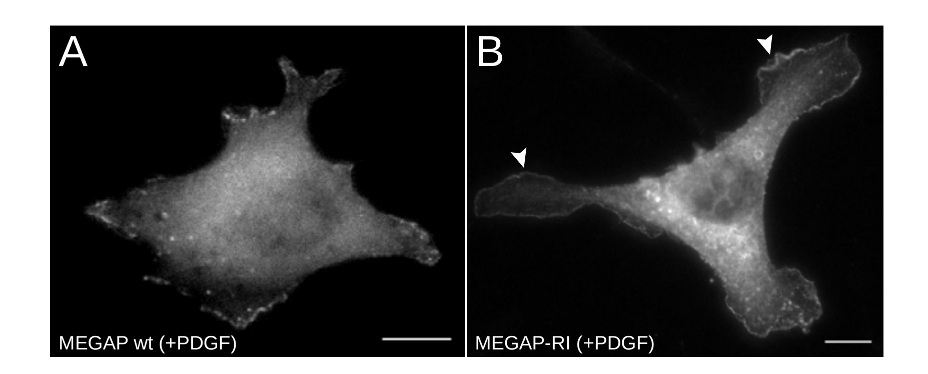


Abbildung 28: Inhibierung von PDGF-stimulierten Lamellipodien durch Wildtyp MEGAP, aber nicht durch die GAP-defiziente Mutante MEGAP-RI. Epifluoreszenzaufnahmen von PDGF-stimulierten (4 min, 100 ng/ml) NIH-3T3 Zellen, ausgesät auf Fibronektin und transfiziert mit MEGAP-EYFP Expressionskonstrukten. Im Gegensatz zu Wildtyp MEGAP (A) konnten Zellen, welche mit dem GAP-defizienten MEGAP-RI transfiziert waren (B), ausgeprägte PDGF-induzierte Lamellipodien ausbilden (weiße Pfeile). Die Maßstabsbalken in (A) und (B) entsprechen 10 µm.

Ein Kernpunkt der funktionellen Charakterisierung der Interaktion zwischen MEGAP und Lpd bestand in der Identifikation MEGAP-spezifischer Effekte auf Lpd und Lamellipodien-Dynamiken. Zu diesem Zweck wurden NIH-3T3 Zellen mit EYFP-markiertem MEGAP

bzw. Lpd transient transfiziert und die lebenden Zellen unter PDGF-Stimulierung gefilmt („Live Cell Imaging"). Vor der Behandlung mit PDGF konnten distinkte Unterschiede bezüglich der Verteilung von MEGAP und Lpd innerhalb der Zelle beobachtet werden. Unter Serum-reduzierten Bedingungen wurde MEGAP in Form einer deutlich abgegrenzten Linie entlang der Zellmembran detektiert. Lpd hingegen präsentierte nur eine diffuse zytoplasmatische Lokalisation. Nach der Stimulierung mit PDGF löste sich MEGAP von der Membran ab und hemmte gleichzeitig die Ausbildung von Lamellipodien (Abbildung 29, Abbildung 31B). Bei Überexpression von Lpd wurde nach der Stimulierung mit PDGF eine entgegengesetzte Reaktion beobachtet. In diesem Fall produzierten die Zellen ausgeprägte Lamellipodien, an deren Migrationsfront Lpd angereichert wurde (Abbildung 30, Abbildung 31B). Das aufgezeigte Verhalten von Lpd wurde ebenfalls für Rat2 Fibroblasten, für WI-38 Humane Lungenfibroblasten sowie für B16-F1 Maus Melanoma Zellen beschrieben (Krause et al., 2004).

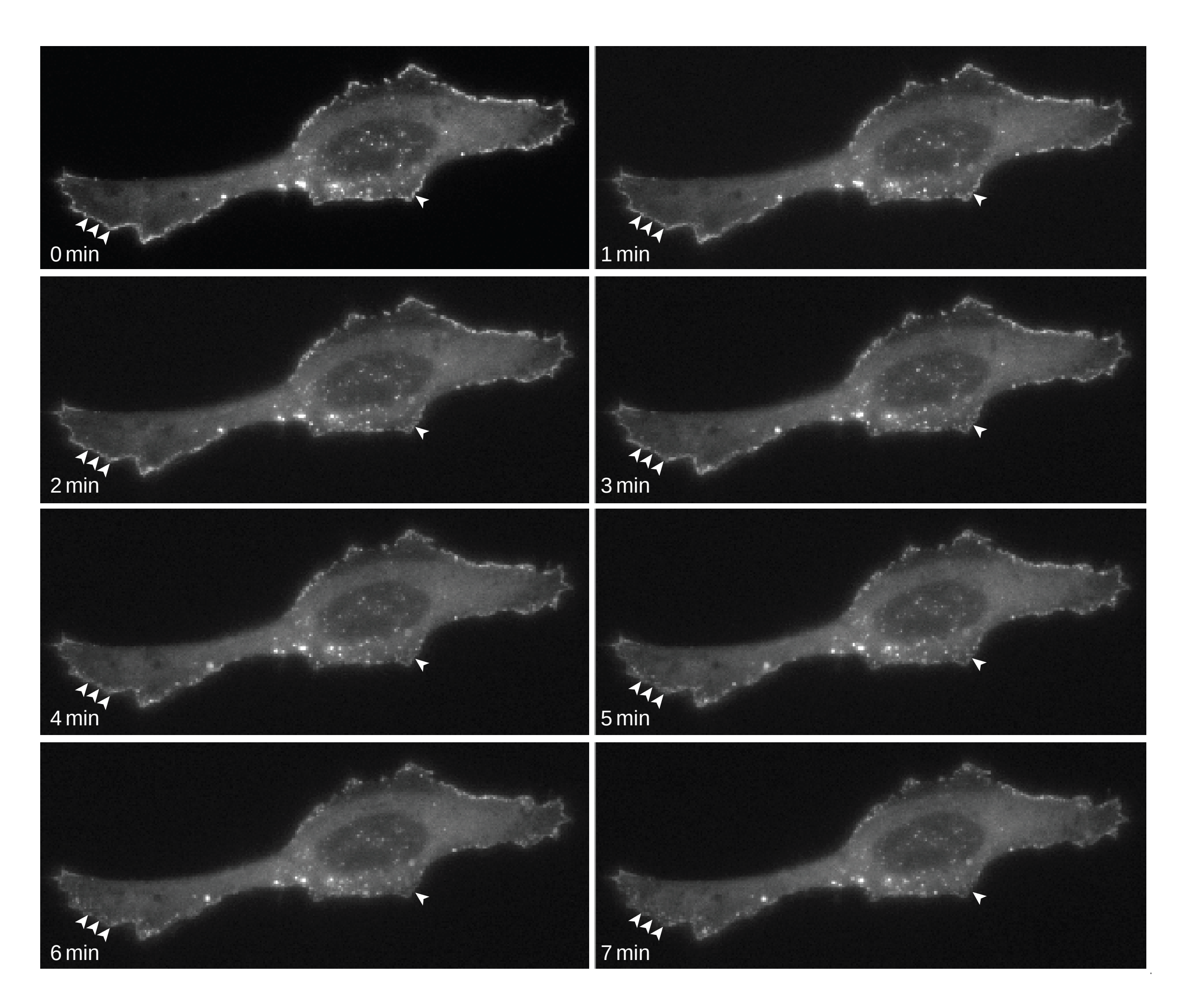


Abbildung 29: Zeitrafferaufnahme einer NIH-3T3 Zelle unter Serum-Reduktion und PDGF-Stimulierung bei Zeitpunkt 0 min. Die Zelle wurde mit Wildtyp MEGAP-EYFP transfiziert. Nach der Stimulierung mit PDGF löste sich MEGAP von der Zellmembran und hemmte durch die GAP-Aktivität zusätzlich die Ausbildung von Lamellipodien.

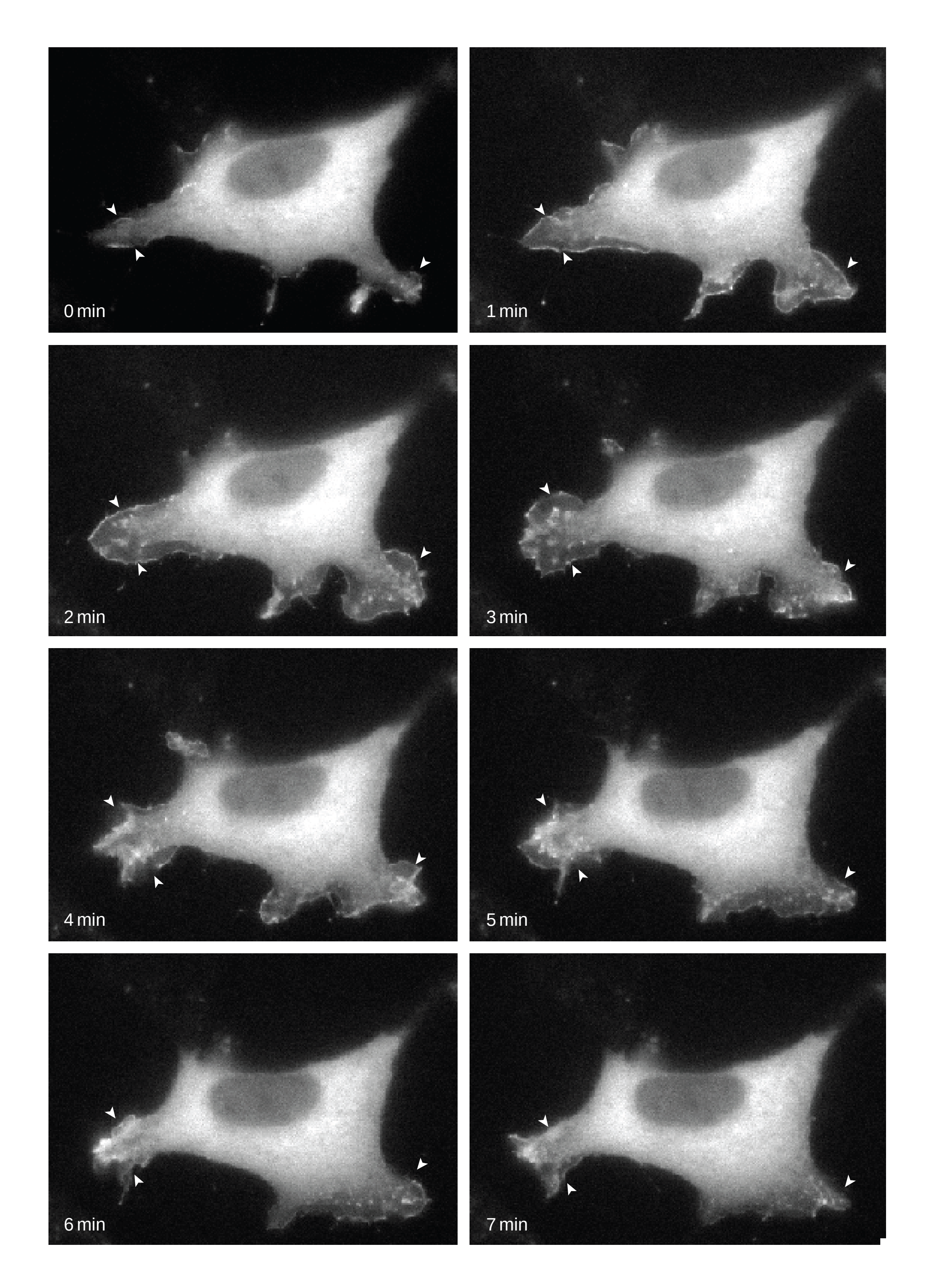


Abbildung 30: Zeitrafferaufnahme einer mit EYFP-Lpd transfizierten NIH-3T3 Zelle unter Serum-Reduktion und PDGF-Stimulierung bei Zeitpunkt 0 min. Nach der Behandlung mit PDGF erfolgte eine stark ausgeprägte Bildung von Lamellipodien, an deren Migrationsfront Lamellipodin angereichert wurde. Die Membranlokalisation von Lpd war hauptsächlich während des Auswachsens der Lamellipodien zu beobachten (Filmausschnitte bei 1, 2 und 3 min).

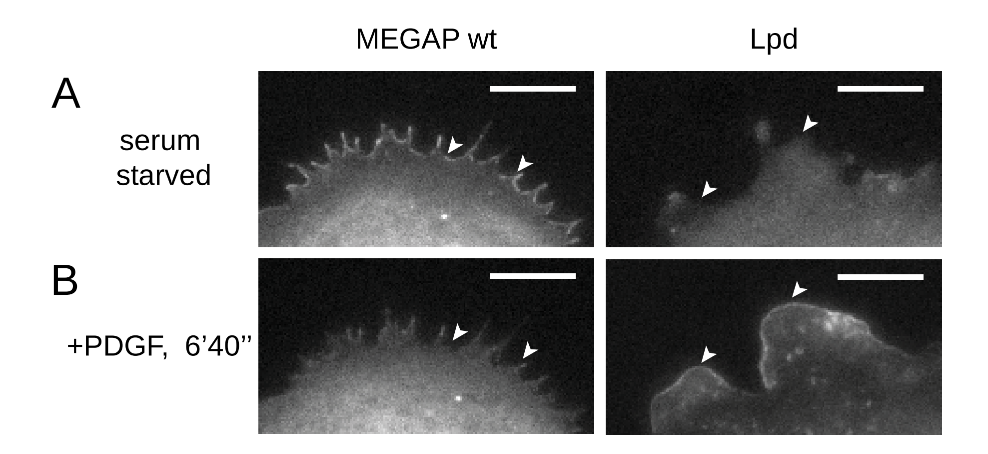


Abbildung 31: Gegenüberstellung der Umlagerung von MEGAP und Lpd nach Stimulierung durch PDGF. Filmaufnahmen (Epifluoreszenz) von NIH-3T3 Zellen, ausgesät auf Fibronektin und stimuliert mit PDGF. NIH-3T3 Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für EYFP-markiertes MEGAP bzw. Lpd transfiziert. **(A)** Unter Serum-reduzierten Bedingungen (Zeitpunkt 0 min) konnte MEGAP explizit an der Zellmembran detektiert werden, Lpd wies nur eine diffuse zytoplasmatische Lokalisation auf (weiße Pfeile). **(B)** Die Stimulierung durch PDGF initiierte sowohl bei MEGAP als auch bei Lpd eine Umlagerung innerhalb der Zelle. MEGAP löste sich fast komplett von der Zellmembran und hemmte gleichzeitig das Auswachsen von Lamellipodien. Im Gegensatz dazu reagierten die mit EYFP-Lpd transfizierten Zellen aktiv auf die PDGF-Stimulierung und bildeten ausgeprägte Lamellipodien. Hierbei konnte eine Anreicherung von Lpd an der Migrationsfront von auswachsenden Lamellipodien beobachtet werden. Die Maßstabsbalken in (A) und (B) entsprechen 10 µm.

Die Einzeltransfektionen von Wildtyp MEGAP und Lpd in den NIH-3T3 Zellen haben das gegensätzliche Verhalten beider Proteine nach der Stimulierung durch PDGF aufgezeigt. Mit Hilfe von Zeitrafferfilmen von MEGAP (Wildtyp und MEGAP-RI) und Lpd co-transfizierten Zellen sollte nun die funktionelle Verbindung zwischen MEGAP und Lpd untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte auch die Frage beantwortet werden, ob Lpd dem starken inhibierenden Effekt von MEGAP auf die Rac1- und WAVE-1-Signaltransduktion entgegenwirken kann.

Die MEGAP-SH3-Mutante Y755D wurde in diese Experimente nicht einbezogen, da sie weder eine Interaktion noch eine Co-Lokalisation mit Lpd aufwies.

Die Aufnahmen von PDGF-stimulierten Zellen demonstrierten unter Co-Expression von Wildtyp MEGAP und Lpd eine starke Inhibierung der Lamellipodien-Dynamik. Trotz der Überexpression von Lpd wurden nach der Behandlung mit PDGF fast keine Lamellipodien gebildet. Die restlichen Zellfortsätze wiesen drastisch verringerte Umfänge und ein verlangsamtes Wachstumsverhalten auf (Abbildung 32A). Eine ähnliche Situation wurde bei der Co-Expression von MEGAP-RI und Lpd beobachtet. Da MEGAP-RI aufgrund

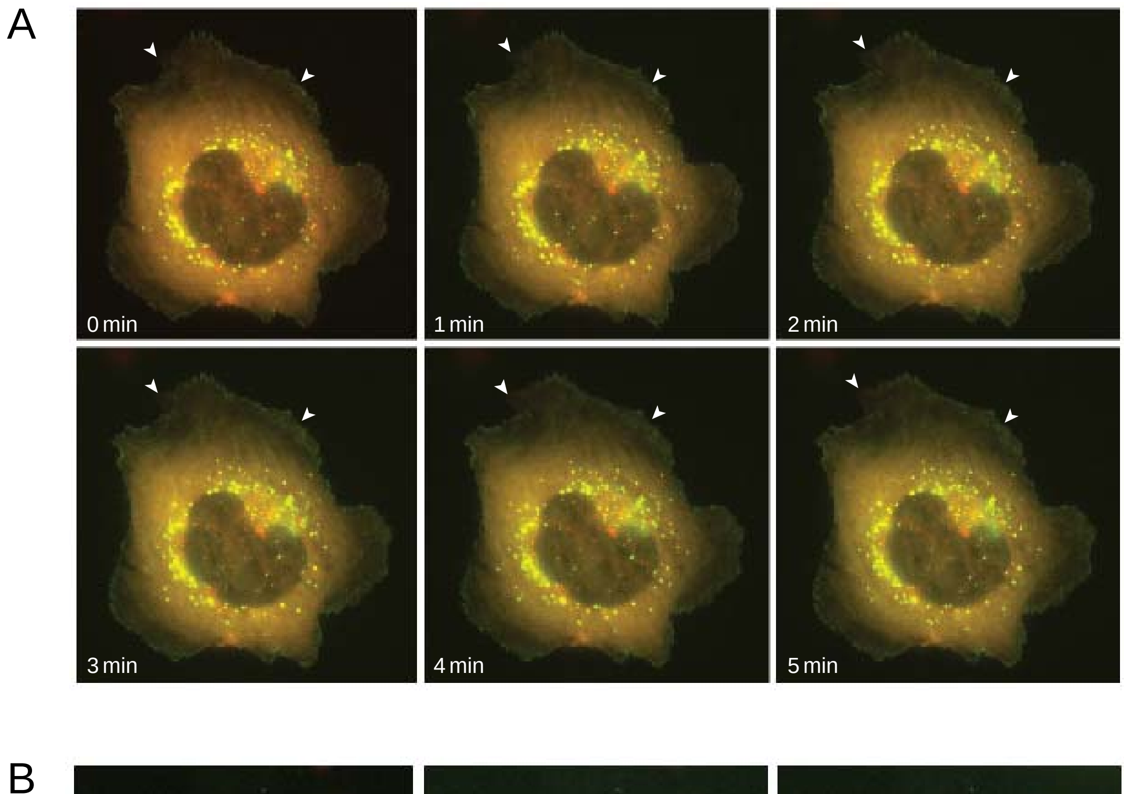
seiner GAP-Defizienz keinen hemmenden Einfluss auf die Rac1-Signaltransduktion ausübt, zeigte sich hier im Vergleich zu Wildtyp MEGAP eine leicht verstärkte Lamellipodien-Dynamik (Abbildung 32B).

Um die Auswirkungen von Wildtyp MEGAP und der GAP-Mutante MEGAP-RI auf Lpd und die damit verbundene Lamellipodien-Dynamik zu quantifizieren, wurden die Wachstumsgeschwindigkeiten der Lamellipodien mittels Kymographie berechnet (vgl. Abschnitt 2.15, Abbildung 15A). Zusätzlich wurden die Umfänge der gebildeten Lamellipodien an den jeweiligen Wachstumsmaxima vermessen und im Verhältnis zum Umfang der gesamten unstimulierten Zelle gesetzt (Abbildung 15B).

Die Wachstumsgeschwindigkeiten von PDGF-induzierten Lamellipodien wurden unter Einzel- und Co-Expression von Lpd und MEGAP (Wildtyp und GAP-Mutante) verglichen (Abbildung 33A). Des Weiteren wurden EYFP-transfizierte Zellen als Kontrolle verwendet. Die statistische Auswertung der Unterschiede zwischen den Wachstumsgeschwindigkeiten der primären Lamellipodien belegte die Beobachtung, dass sowohl Wildtyp MEGAP als auch die GAP-Mutante MEGAP-RI die Dynamik von auswachsenden Lamellipodien hemmen. Im Gegensatz dazu erfolgte durch die Überexpression von Lpd im Vergleich zu den EYFP-transfizierten Kontrollzellen eine signifikante Erhöhung der lamellipodialen Wachstumsgeschwindigkeiten (Krause et al., 2004). Durch die Co-Expression von MEGAP wurde dieser Effekt aufgehoben und die Wachstumsgeschwindigkeiten der Lamellipodien weit unter den Wert der Kontrollzellen reduziert. Aufgrund der GTPase-aktivierenden Funktion von MEGAP war der inhibierende Effekt auf Lpd und die damit verbundene Lamellipodien-Dynamik besonders ausgeprägt. Die starke Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeiten spiegelte die Tatsache wider, dass MEGAP die Ausbildung von Zellfortsätzen generell hemmte. Die Co-Expression von MEGAP-RI und Lpd führte ebenfalls zu einer Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeiten. Diese waren jedoch aufgrund der GAP-Defizienz im Verhältnis zur Co-Expression von Wildtyp MEGAP und Lpd leicht erhöht.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass MEGAP-RI unter Co-Expression mit Lpd nicht nur die Wachstumsgeschwindigkeiten von Lamellipodien verringerte sondern auch dem stimulierenden Effekt von Lpd auf die Umfänge von Zellfortsätzen entgegenwirkte (Abbildung 33B). Somit wurde demonstriert, dass MEGAP einen GAP-unabhängigen, inhibierenden Effekt auf Lpd und damit verbundene Aktin-Dynamiken ausübt.

A



B

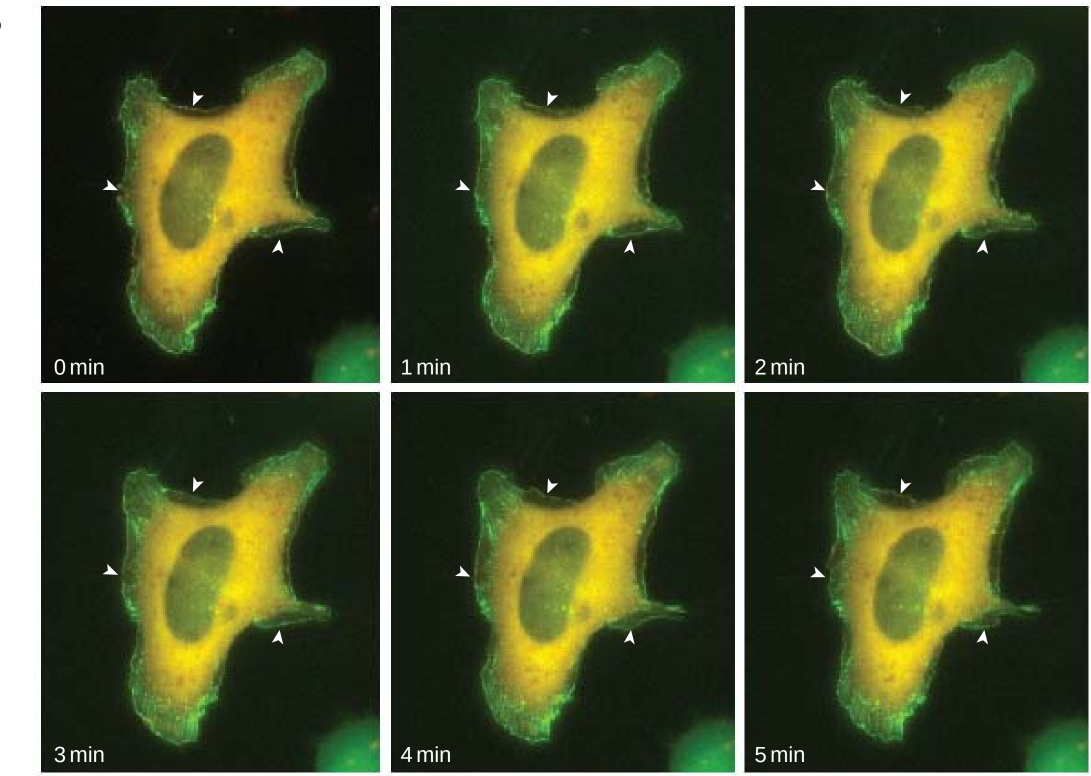


Abbildung 32: Zeitrafferaufnahmen von NIH-3T3 Zellen unter Serum-Reduktion und Stimulierung durch PDGF bei Zeitpunkt 0 min. **A)** Transfektion der Zelle mit Wildtyp MEGAP-EYFP (grün) und mCherry-Lpd (rot). Aufgrund des starken inhibierenden Effektes von MEGAP bildete die Zelle trotz Überexpression von Lpd kaum Zellfortsätze aus. **B)** Co-Transfektion von EYFP-markiertem MEGAP-RI (grün) und mCherry-Lpd. Im Vergleich zur Co-Expression von Wildtyp MEGAP und Lpd (A) zeigte die Zelle leicht erhöhte Lamellipodien-Dynamik nach Stimulierung durch PDGF. Jedoch waren durch die Expression von MEGAP-RI sowohl die Wachstumsgeschwindigkeiten als auch die Umfänge von den gebildeten Zellfortsätzen verringert.

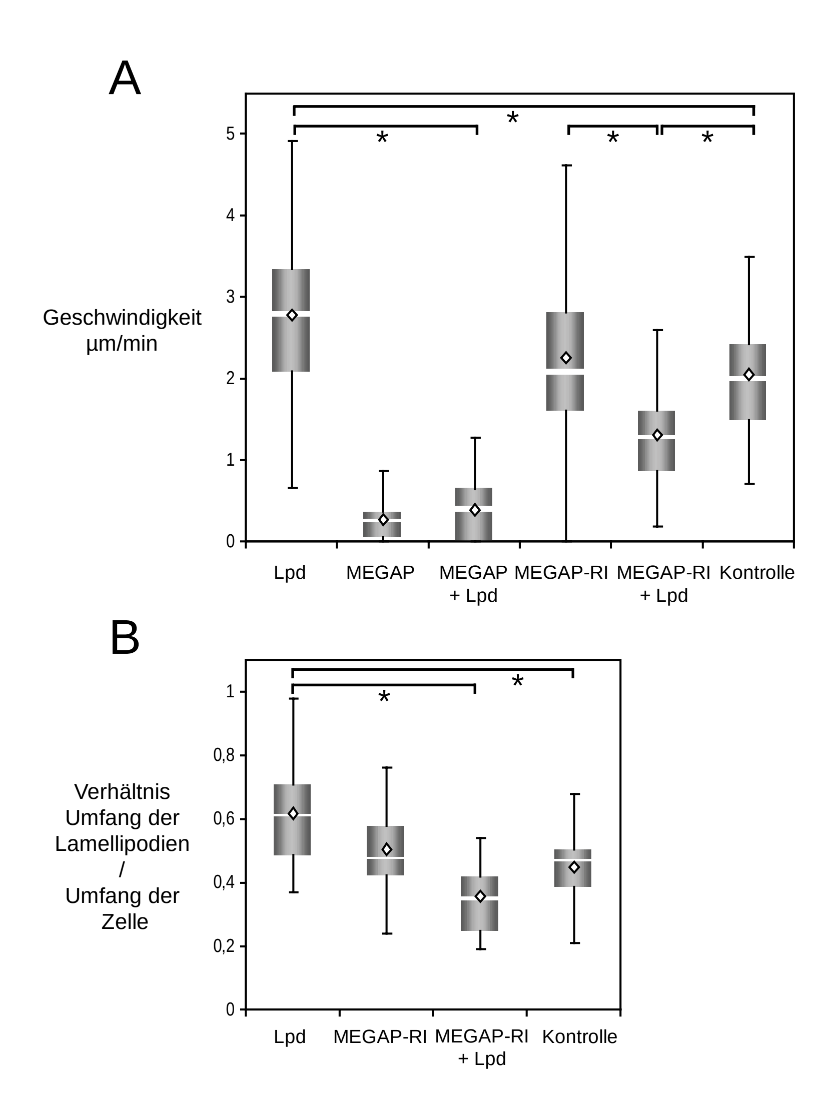


Abbildung 33: Inhibierung der Lamellipodien-Dynamik aufgrund der Interaktion zwischen MEGAP und Lpd. (A) „Box and Whisker Plots“ zur Darstellung der Wachstumsgeschwindigkeiten primärer Lamellipodien in NIH-3T3 Zellen nach Stimulierung durch PDGF. Gegenübergestellt sind Geschwindigkeitswerte für Einzel- bzw. Co-Expression von fluoreszenzmarkiertem Lpd und MEGAP (Wildtyp und GAP-Mutante MEGAP-RI). Als Kontrolle wurden EYFP-transfizierte Zellen analysiert. In einem „Box and Whisker Plot“ entsprechen der untere bzw. obere Rand der Box dem 25%- und 75%-Quartil, die äußeren Linien („whiskers“) begrenzen das 10. bzw. 90. Perzentil eines Datensatzes. Die Punkte markieren die Median- und die Linien die Mittelwerte in den einzelnen Boxen. Die Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeiten erfolgte mittels Kymographie (Abschnitt 2.15), wobei alle auswachsenden Lamellipodien einer Zelle einbezogen wurden. Für jeden Datensatz wurden mindestens 25 Zellen untersucht. Die statistische Auswertung der Ergebnisse zeigte auf, dass sowohl Wildtyp MEGAP als auch, in geringerem Ausmaß, die GAP-Mutante MEGAP-RI einen hemmenden Effekt auf die Wachstumsgeschwindigkeiten von Lamellipodien ausüben. **(B)** Quantifizierung der Lamellipodienumfänge nach PDGF-Stimulierung im Verhältnis zum Gesamtumfang der unstimulierten Zelle, dargestellt mittels „Box and Whisker Plot“. Aufgrund der starken GAP-Aktivität von Wildtyp MEGAP war nur bei MEGAP-RI eine Analyse der Umfangverhältnisse möglich. Hierbei konnte belegt werden, dass die Co-Expression von MEGAP-RI nicht nur die Dynamik von auswachsenden Lamellipodien reduziert, sondern auch dem stimulierenden Effekt von Lpd bezüglich der Lamellipodienumfänge entgegenwirkt. Die Sternsymbole in (A) und (B) geben signifikante Abweichungen von $p \leq 0.05$ an.

3.7 Die Inhibierung von Lamellipodin erfolgt durch die MEGAP-abhängige Lokalisierung an Fokale Adhäsionen

Die quantitative Beurteilung der Lamellipodien-Dynamik in MEGAP und Lpd co-exprimierenden Zellen konnte den hemmenden Effekt von MEGAP auf Lpd zeigen. Um weitere Einblicke in den biochemischen Mechanismus für diesen Prozess zu erhalten, wurde untersucht, an welchen zellulären Strukturen MEGAP die Funktion von Lpd beeinflusst. Zu diesem Zweck sollten die Regionen mit eindeutiger Co-Lokalisation von MEGAP und Lpd charakterisiert werden.

Insbesondere die Co-Expression von MEGAP-RI und Lpd zeigte Co-Lokalisationsmuster, welche sehr den Enden von F-Aktin Stressfasern ähnelten. Diese sind häufig mit Fokalen Adhäsionen assoziiert (Mattila and Lappalainen, 2008). Um diese Beobachtungen zu bestätigen, wurden MEGAP-EYFP exprimierende Zellen gegen F-Aktin und den Fokalen Adhäsions-Marker Vinculin gefärbt. Mit Hilfe von TIRF-Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass sowohl Wildtyp MEGAP als auch die GAP-Mutante MEGAP-RI an die Enden von F-Aktin Stressfasern (Abbildung 34A) und an Vinculin-markierte Fokale Adhäsionen lokalisieren (Abbildung 34B). Für die Isolation MEGAP-abhängiger Effekte auf die Lokalisation von Lpd wurden EYFP-Lpd exprimierende Zellen ebenfalls gegen Vinculin gefärbt. Im Gegensatz zu MEGAP wurde Lpd zwar in direkter Nähe von Membranfortsätzen aber nicht an Vinculin-markierten Fokalen Adhäsionen detektiert (Abbildung 34C), (Krause et al., 2004). Die gleiche Abwesenheit von Lpd an den Strukturen Fokaler Adhäsionen konnte unter Co-Expression mit der MEGAP-SH3-Mutante Y755D, welche nicht mit Lpd interagiert (vgl. Abschnitt 3.3), beobachtet werden. Daher stellte sich nun die Frage, ob diese MEGAP-SH3-abhängige Lokalisation an Fokale Adhäsionen auch für den inhibierenden Effekt von MEGAP auf Lpd und damit verbundene Aktin-Dynamiken verantwortlich war. Zur Analyse dieser Frage wurden PDGF-behandelte Zellen unter Co-Expression von Lpd und MEGAP (Wildtyp und SH3-Mutante Y755D) im TIRF-Modus gefilmt. Während Lpd und Wildtyp MEGAP co-transfizierte Zellen kaum auf die PDGF-Stimulierung reagierten (Abbildung 35A), ermöglichte die Co-Expression von MEGAP-Y755D und Lpd die Bildung kleiner Lamellipodien (Abbildung 35B). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich Lpd unter Co-Expression mit der SH3-Mutante innerhalb der auswachsenden Lamellipodien anreicherte. Somit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Bindung von MEGAP an Lpd sowie die Umlagerung von Lpd an Fokale Adhäsionen die Lpd-assoziierten Aktin-Dynamiken beeinflussen kann.

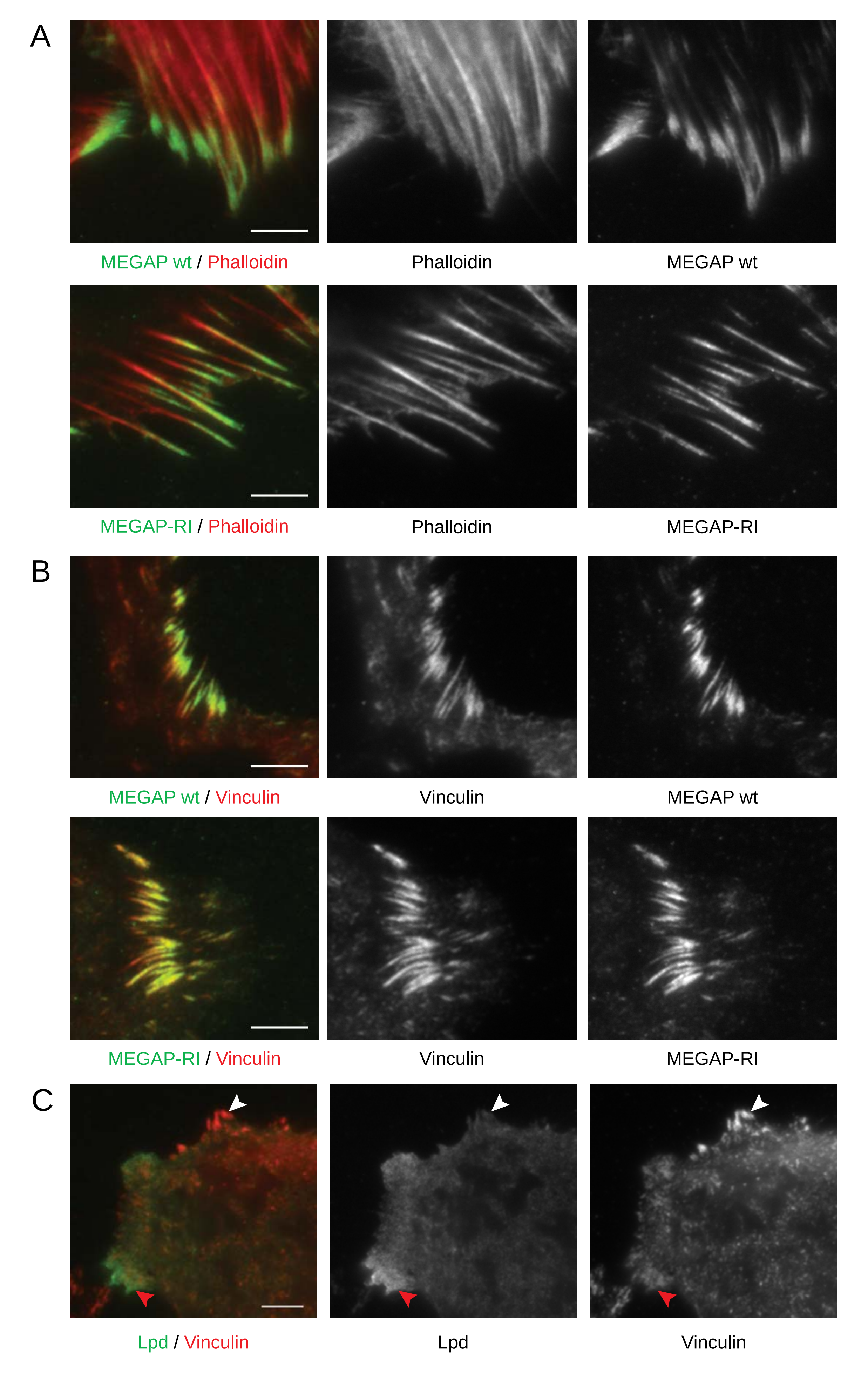

A
MEGAP wt / Phalloidin
Phalloidin
MEGAP wt
MEGAP-RI / Phalloidin
Phalloidin
MEGAP-RI
B
MEGAP wt / Vinculin
Vinculin
MEGAP wt
MEGAP-RI / Vinculin
Vinculin
MEGAP-RI
C
Lpd / Vinculin
Lpd
Vinculin

Abbildung 34: MEGAP lokalisiert an die Enden von Aktinfasern und an Vinculin markierte Fokale Adhäsionen. Dargestellt sind TIRF-Aufnahmen von NIH-3T3 Zellen unter Serum-reduzierten Bedingungen. **(A)** NIH-3T3 Zellen wurden mit MEGAP-EYFP Expressionskonstrukten (Wildtyp und GAP-Mutante MEGAP-RI) transfiziert. Nach der Fixierung erfolgte eine Färbung des F-Aktins mit TRITC-konjugiertem Phalloidin. Unabhängig von der GAP-Aktivität wurden sowohl Wildtyp MEGAP als auch MEGAP-RI an den Enden von Aktinfasern detektiert. **(B)** Analog zu (A) wurden NIH-3T3 Zellen mit MEGAP-EYFP Expressionskonstrukten transfiziert und mit einem Vinculin-spezifischen Antikörper gefärbt. Für Wildtyp MEGAP und MEGAP-RI konnte eine Co-Lokalisation mit Vinculin an Fokalen Adhäsionen beobachtet werden. **(C)** NIH-3T3 Zellen wurden mit einem EYFP-Lpd Expressionskonstrukt transfiziert und anschließend gegen Vinculin gefärbt. Im Gegensatz zu MEGAP wurde Lpd nicht an Vinculin-markierten Fokalen Adhäsionen (weißer Pfeil) sondern in der Nähe von Membranfortsätzen detektiert (roter Pfeil). Die Maßstabsbalken in (A) bis (C) entsprechen 5 µm.

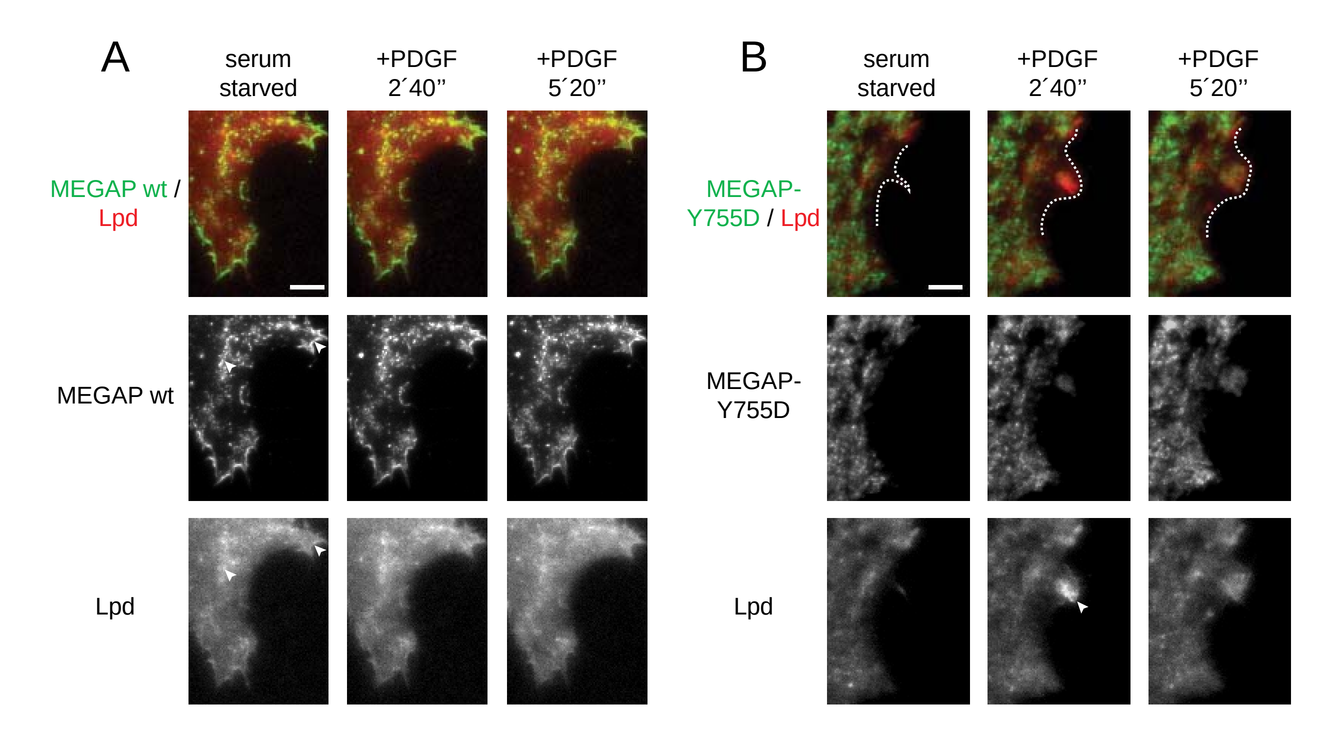


Abbildung 35: Die MEGAP-SH3-Mutante Y755D ermöglicht die Ausbildung von Lamellipodien. Filmaufnahmen (TIRF) von transient transfizierten NIH-3T3 Zellen unter Serum-Reduktion und Stimulierung durch PDGF (bei Zeitpunkt 0 min). **(A)** NIH-3T3 Zellen wurden mit Wildtyp MEGAP-EYFP und mCherry-Lpd Expressionskonstrukten co-transfiziert. MEGAP und Lpd zeigten überlappende Proteinlokalisation und konnten an Fokalen Adhäsionen detektiert werden (weiße Pfeile). Aufgrund der starken Inhibierung durch Wildtyp MEGAP erfolgte keine Ausbildung von Lamellipodien nach der Behandlung mit PDGF. **(B)** NIH-3T3 Zellen wurden mit der EYFP-markierten MEGAP-SH3-Mutante Y755D und mit mCherry-Lpd co-transfiziert. Vor der Stimulierung durch PDGF zeigten MEGAP-Y755D und Lpd weder Co-Lokalisation noch konnte die Lokalisation an distinkte zellulären Strukturen beobachtet werden. Im Gegensatz zu (A) initiierte die Stimulierung mit PDGF das Auswachsen eines kleinen Lamellipodiums (gestrichelte Linie), an dessen Migrationsfront Lpd angereichert wurde (Pfeil). Die Maßstabsbalken in (A) und (B) entsprechen 5 µm.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in dieser Arbeit die bisher unbekannte Interaktion zwischen MEGAP und dem Ena/VASP bindenden Protein Lamellipodin (Lpd) identifiziert und charakterisiert wurde. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die MEGAP-SH3 Domäne die Bindung von MEGAP an Lpd vermittelt und MEGAP einen hemmenden Effekt auf Lpd ausübt. Die Inhibierung von Lpd erfolgt vermutlich über die Lokalisierung an Fokale Adhäsionen.

4 Diskussion

4.1 Identifizierung neuer MEGAP-Interaktionspartner

Makromolekulare Interaktionen wie Protein-Protein Interaktionen sind essentiell für alle biologischen Prozesse, von der Ausbildung zellulärer Strukturen und enzymatischen Reaktionen bis hin zur Regulation von Signaltransduktionskaskaden. Daher fungieren die meisten Proteine als stabile oder transiente Komplexe mit anderen Proteinen, wobei eine dynamische Generierung und Degradation der Proteinkomplexe stattfindet (Alberts, 1998; Grigoriev, 2003; Kerrien *et al.*, 2007). Die Analyse des so genannten Interaktoms einer Zelle bzw. eines Zelltyps ist somit unerlässlich, um sowohl die Funktion einzelner Komponenten als auch die Zelle oder den Organismus als Einheit zu verstehen (Kelly and Stumpf, 2008).

4.1.1 Isolierung MEGAP-bindender Proteine mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid Systems

Für die gezielte Suche nach bisher unbekannten Protein-Protein Interaktionen wurde u.a. das Yeast-Two-Hybrid System entwickelt. Seit seiner Etablierung (Fields and Song, 1989) wurden mit dieser Methode Details vieler biologischer Signalwege entdeckt. Hierbei stellen die verwendeten Hefen ein Modellsystem für die biologischen Abläufe in eukaryontischen Zellen dar. Dies bietet einen großen Vorteil im Vergleich zur Anwendung bakterieller, prokaryontischer Systeme.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Yeast-Two-Hybrid Screen mit einem C-terminalen Fragment von MEGAP (MEGAP-C) und einer humanen fötalen Gehirn cDNA-Bibliothek durchgeführt. Vor dem eigentlichen Yeast-Two-Hybrid Screen wurde die bereits bekannte Interaktion zwischen MEGAP und der CC3-Domäne des Rezeptors Robo1 als Positivkontrolle im Hefesystem getestet. Aufgrund der Interaktion zwischen MEGAP und Robo1 sollte der Transkriptionsfaktor GAL4 rekonstituiert und somit die in dem Hefestamm enthaltenen Reportergene exprimiert werden. Die Aktivierung des Reportergens *lacZ* wurde mit Hilfe des ß-Galactosidase Flüssigassays quantifiziert. Hierbei konnte nur eine mäßig starke Aktivierung des *lacZ* Gens beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde in früheren Studien mittels GST-Pulldown und Co-IP eine starke Interaktion zwischen der MEGAP-SH3 Domäne und Robo1 detektiert (vgl. Abbildung 23). Diese Diskrepanz wies bereits darauf hin, dass die post-translationale Modifikation des MEGAP-Proteins in Hefen und Menschen

möglicherweise nicht komplett übereinstimmt. Da jedoch im Vergleich zur Negativkontrolle die Co-Expression von MEGAP-C und Robo1-CC3 eindeutig die Expression der Reportergene *lacZ* und *HIS3* aktivieren konnte, wurde der Yeast-Two-Hybrid Screen mit dem MEGAP-C Fragment durchgeführt. Die im Rahmen des Yeast-Two-Hybrid Screens identifizierten putativen Interaktionspartner waren u.a. die „Protein Phosphatase 1" (CAT53), das nukleäre Protein Periphilin sowie die „Focal Adhesion Kinase 1" (FAK). Die FAK musste zusammen mit weiteren cDNA-Klonen sehr früh aussortiert werden, da diese in Bezug auf die Vektorsequenz eine Verschiebung des Leserasters aufwiesen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde jedoch die Assoziation zwischen MEGAP und Fokalen Adhäsionen entdeckt. Obwohl die Isolierung der FAK für das Ergebnis des Yeast-Two-Hybrid Screens keine Relevanz besitzt, wäre es eventuell sinnvoll, eine mögliche Interaktion zwischen MEGAP und der FAK mit Hilfe weiterer Methoden zu überprüfen.

Die Enzymkomplexe, welche die Translation, Faltung und post-translationale Modifikation von Proteinen ermöglichen, sind nicht in allen Organismen identisch. So existieren auch Unterschiede zwischen Hefen und den Zellen der Vertebraten, obwohl beide Systeme eukaryontische Eigenschaften besitzen. Demnach besteht eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Phosphorylierung oder andere post-translationale Modifikationen von MEGAP im Hefesystem nicht realisiert werden konnten. Folglich wurden Interaktionen, welche zum Beispiel auf der Phosphorylierung einzelner AS-Reste des MEGAP-Proteins basieren, im Hefesystem nicht erfasst. In diesem Zusammenhang wurde für MEGAP bereits gezeigt, dass über die Phosphorylierung des C-terminalen Tyrosinrestes Y755 die Interaktion zwischen MEGAP und WAVE-1 reguliert wird (Endris *et al.*, 2009). Des Weiteren besitzt MEGAP eine Vielzahl an Serin- und Threoninresten, deren Phosphorylierungsstatus bisher nicht ausreichend analysiert worden ist. Zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass das verkürzte MEGAP Proteinfragment nach der Translation nicht korrekt gefaltet wurde. Dieser Effekt ist möglicherweise durch die Generierung eines Fusionsproteins aus der DNA-bindenden Domäne von GAL4 und MEGAP-C verstärkt worden. Die veränderte Tertiärstruktur könnte somit auch die Bindungseigenschaften von MEGAP-C zu putativen Interaktionspartnern beeinflusst haben.

Neben der fehlerhaften Expression einiger humaner Proteine im Hefesystem stellen die autoaktivierenden Eigenschaften vieler Fusionsproteine ein weiteres Hindernis für die Isolierung echter Interaktionspartner dar. Sobald einer der putativen Bindungspartner die Expression der analysierten Reportergene allein aktivieren kann, existiert keine Möglichkeit, diesen Kandidaten im Hefesystem zu verifizieren. Daher mussten Hefeklone, welche ein

Protein mit autoaktivierenden Eigenschaften exprimierten als negativ bezüglich der Interaktion zu MEGAP-C bewertet werden. Ein extremes Beispiel für diese Situation stellte ein Hefeklon dar, welcher neben MEGAP-C die Phosphatase CAT53 exprimierte. Hier zeigte sich erst nach dem Austausch der Expressionsvektoren („Library Swap“), dass CAT53 auch ohne die Co-Expression von MEGAP-C die Expression des *lacZ* Gens in sehr starkem Ausmaß induzieren konnte.

Der einzige Kandidat, welcher als putativer MEGAP-Interaktionspartner aus dem Yeast-Two-Hybrid Screen hervorging, war das nukleäre Protein Periphilin. Sowohl die Analyse der Reporteraktivitäten als auch die Kontrollexperimente bezüglich autoaktivierender Eigenschaften wiesen auf eine Interaktion zwischen MEGAP und Periphilin hin. Obwohl das Yeast-Two-Hybrid System entwickelt wurde, um binäre, direkte Interaktionen zwischen Proteinen zu messen, können indirekte Interaktionen nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund müssen die isolierten Bindungspartner jeweils mit Hilfe weiterer Methoden verifiziert werden. Da die putative Assoziation zwischen der MEGAP-SH3 Domäne und Periphilin mittels GST-Pulldown nicht bestätigt werden konnte, wurde Periphilin ebenfalls als falsch positiver Kandidat aussortiert. Allerdings enthielt das im Yeast-Two-Hybrid Screen verwendete C-terminale MEGAP-Fragment nicht nur die MEGAP-SH3 Domäne sondern auch die so genannte KID-Domäne („Kinase Interacting Domain“), über welche die Interaktion zwischen MEGAP und c-Abl vermittelt wird (Endris *et al.*, 2009). Daher besteht die Möglichkeit, dass MEGAP über die KID-Domäne oder andere Bereiche innerhalb des C-terminalen MEGAP-Fragments mit Periphilin interagiert.

Auch wenn zwei Proteine sowohl im Hefesystem als auch im Rahmen biochemischer Bindungsstudien eindeutig miteinander interagieren, sagt dies noch nichts über die physiologische Relevanz dieser Interaktion aus. Für die tatsächliche Ausbildung von Proteinkomplexen müssen die Bindungspartner sowohl im gleichen Zellkompartiment als auch zur gleichen Zeit exprimiert werden. Da MEGAP zur Gruppe der zytoplasmatischen Proteine gehört, wäre die Interaktion mit einem Kernprotein wie Periphilin zwar nicht auszuschließen aber nicht unbedingt wahrscheinlich.

Ein weiterer Grund für die ausschließliche Selektion falsch positiver Klone könnte generell auch die verwendete cDNA-Bibliothek sein. Die Analyse des Expressionsmusters von *Megap* zeigte jedoch eine Präsenz der *Megap* mRNA in weiten Bereichen des sich entwickelnden Nervensystems auf. Daher sollten mögliche MEGAP-Interaktionspartner auch in einer humanen fötalen Gehirn cDNA-Bibliothek enthalten sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid Sytems die parallele Analyse einer Vielzahl an putativen Protein-Protein Interaktionen realisierbar ist. Allerdings müssen gegebenenfalls die Unterschiede der Proteinexpression zwischen Hefen und Menschen berücksichtigt werden. Es ist zu vermuten, dass bei dem durchgeführten Yeast-Two-Hybrid Screen eines der Hauptprobleme in der post-translationalen Modifikation von MEGAP-C begründet war, wodurch das Protein nicht korrekt exprimiert wurde und physiologisch relevante Interaktionspartner nicht erfasst werden konnten.

4.1.2 Putative Interaktionspartner der MEGAP-SH3 Domäne

Neben der Anwendung des Yeast-Two-Hybrid Systems wurden auch biochemische Methoden eingesetzt, um nach bisher unbekannten Interaktionspartnern für MEGAP zu suchen. Im Rahmen von GST-Pulldown Experimenten mit der MEGAP-SH3 Domäne und Proteinlysaten aus HEK293 Zellen sowie adultem Mausgehirn wurden die Proteine Diaphanous Homolog 1 (mDia1), Lamellipodin (Lpd), Komponenten des WAVE-1 Komplexes sowie zwei nukleäre Proteine isoliert (Dr. Volker Endris, unveröffentlichte Daten). Letztere wurden für eine funktionell relevante Interaktion mit der MEGAP-SH3 Domäne aufgrund ihrer Lokalisation im Zellkern nicht in Betracht gezogen. Die Präzipitation des WAVE-1 Komplexes konnte aufgrund der bereits beschriebenen Assoziation zwischen MEGAP und WAVE-1 (Soderling *et al.*, 2002) als intrinsische Positivkontrolle für den GST-Pulldown bewertet werden.

Die Bindung von mDia1 an die MEGAP-SH3 Domäne wurde in der vorliegenden Arbeit nur *in vitro* gezeigt. In den Co-IP Studien mit MEGAP und mDia1 konnte ich keine konsistenten Ergebnisse produzieren, so dass eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen zwar nicht ausgeschlossen aber auch nicht eindeutig belegt werden konnte. Arbeiten zur Bestätigung einer möglichen Interaktion zwischen MEGAP und mDia1 werden gegenwärtig von Simone Steinlicht im Labor fortgeführt.

Obgleich die Assoziation zwischen MEGAP und mDia1 in dieser Arbeit also nicht bewiesen werden konnte, existiert zwischen den beiden Proteinen die Möglichkeit einer funktionellen Verknüpfung aus folgenden Gründen: Das Protein mDia1 („mammalian Diaphanous Homolog 1“) gehört zur großen Familie der Formine und ist, ebenso wie MEGAP, an der Regulation von Aktin-Dynamiken in der Nähe der Zellmembran beteiligt. Sowohl MEGAP als auch mDia1 sind in die Signaltransduktion der kleinen Rho-GTPasen eingebunden, wobei mDia1 durch die Rho-GTPasen RhoA, -B und -C aktiviert wird (Higashi *et al.*, 2008) und im aktivierten Zustand Rac1 aktivieren kann (Kurokawa and Matsuda, 2005). MEGAP hingegen

übt mit Hilfe seiner GAP-Aktivität einen inhibierenden Effekt insbesondere auf die Rho-GTPase Rac1 aus (Endris *et al.*, 2002; Soderling *et al.*, 2002). Aufgrund der gegensätzlichen Wirkung in Bezug auf Rac1 könnte MEGAP die Funktion eines Gegenspielers für mDia1 einnehmen.

Formine sind große Multidomänenproteine und zeichnen sich durch eine hoch konservierte FH2-Domäne („formin homology domain 2“) im C-terminalen Bereich aus, der in den meisten Fällen eine Prolin-reiche FH1-Domäne vorgelagert ist (Wallar and Alberts, 2003; Higgs, 2005). Über die Prolin-reiche FH1-Domäne können Formine sowohl mit Profilin als auch mit den SH3-Domänen oder WW-Motiven anderer Proteine interagieren (Krebs *et al.*, 2001). Folglich liegt die Vermutung nahe, dass MEGAP mit seiner SH3-Domäne eine Bindung zur FH1-Domäne von mDia1 eingehen könnte. Eine Besonderheit der Struktur der so genannten „diaphanous related“ Formine (DRFs) in Säugetieren (einschließlich mDia1) besteht in der intramolekularen Interaktion zwischen einer N-terminalen GTP-bindenden Domäne (GBD) und einer C-terminalen Diaphanous autoregulatorischen Domäne (DAD), über welche die Rückfaltung der Peptidkette und somit eine Autoinhibierung in Abwesenheit von Rho-GTP erfolgt (Faix and Grosse, 2006). Durch die Bindung von Rho-GTP und weiteren Signalfaktoren wird die Interaktion zwischen GBD und DAD aufgehoben und zum Beispiel mDia1 aktiviert. Diese autoregulatorischen Eigenschaften und damit verbundene Änderungen der Proteinkonformation könnten eventuell auch dafür verantwortlich sein, dass die Interaktion zwischen MEGAP und mDia1 im Rahmen der Co-IP Studien nicht eindeutig belegt werden konnte. Die Verwendung von konstitutiv aktivem mDia1 in Form von GBD- und DAD-Deletionskonstrukten wäre in diesem Zusammenhang hilfreich, um die Assoziation zwischen MEGAP und mDia1 genauer zu untersuchen.

4.2 MEGAP interagiert mit dem Ena/VASP bindenden Protein Lamellipodin

4.2.1 Lamellipodin ist an der Regulation von Aktin-Dynamiken beteiligt

In dieser Arbeit wurde die bisher unbekannte Interaktion zwischen MEGAP und dem Ena/VASP bindenden Protein Lamellipodin (Lpd) gezeigt und nachfolgend charakterisiert. Lamellipodin wurde zum ersten Mal im Rahmen einer Suche nach Bindungspartnern für die EVH1-Domäne („Ena/VASP homology 1“) der Ena/VASP Proteinfamilie beschrieben (Krause et al., 2004). In dieser Arbeit konnten Krause et al. den stimulierenden Effekt von

Lpd auf die Aktin-Dynamiken in Lamellipodien aufzeigen. Über die Interaktion zwischen seiner PH-Domäne („Pleckstrin homology domain“) und Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Trisphosphat (PIP3) wird Lpd nach der Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) an die Zellmembran rekrutiert und lokalisiert daher an die Migrationsfront von Lamellipodien und an die Enden von Filopodien. Die Aktivierung der PI3K erfolgt u.a. durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren wie PDGF (vgl. Abbildung 36). Des Weiteren wurde von Krause et al. beobachtet, dass eine Überexpression von Lpd die Zunahme lamellipodialer Wachstumsgeschwindigkeiten auslöst. Die Unterdrückung der Expression von Lpd mit Hilfe Lpd-spezifischer shRNAs („Lpd knockdown“) resultierte in einer drastischen Abnahme der Anzahl auswachsender Lamellipodien sowie in reduzierten Wachstumsgeschwindigkeiten und Lamellipodienumfängen der restlichen Membranfortsätze. Beide Effekte wurden auf eine deutliche Verringerung des F-Aktingehaltes innerhalb der Zellperipherie zurückgeführt. Da Lpd die Lokalisierung der Ena/VASP Proteine an die Zellmembran bewirken kann, wird es als ein Bindeglied zwischen Signalkaskaden an der Zellmembran und Faktoren betrachtet, welche die Aktinpolymerisation begünstigen.

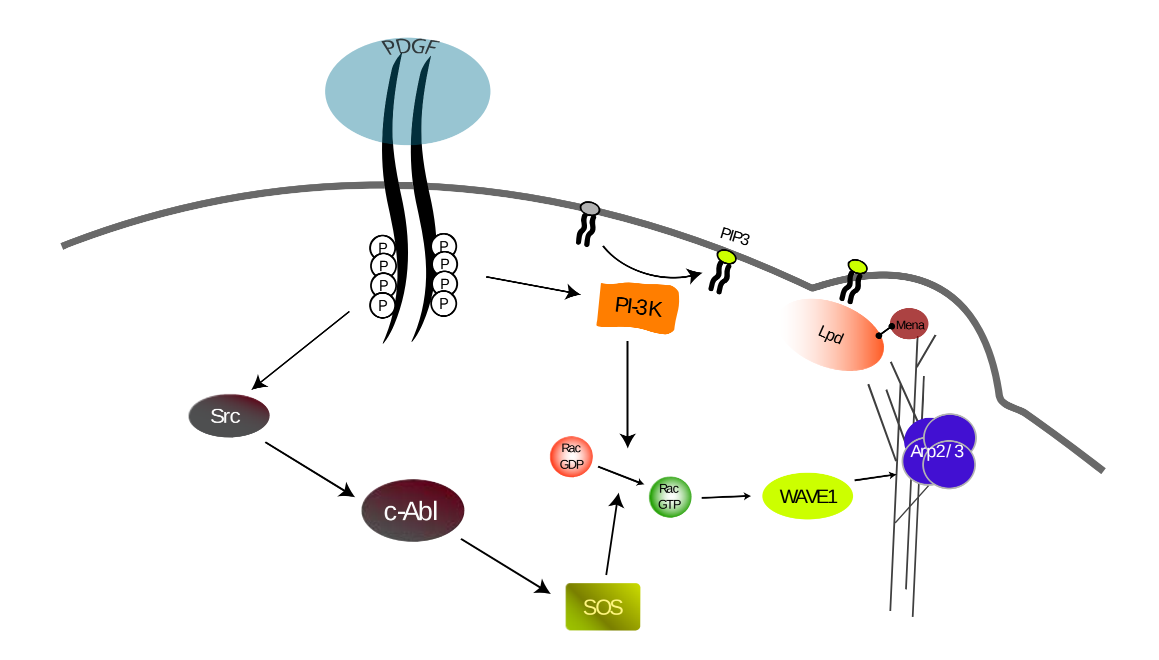


Abbildung 36: Ausbildung von Lamellipodien nach Aktivierung des PDGF-Rezeptors. Durch die Bindung des Wachstumsfaktors PDGF erfolgt die Aktivierung und Dimerisierung des PDGF-Rezeptors, wodurch die Kinasen PI3K und c-Abl aktiviert werden. Sowohl c-Abl als auch PI3K können über die Aktivierung von Regulatoren der kleinen GTPasen wie SOS (Sini *et al.*, 2004) die Bildung von GTP-gebundenem Rac1 initiieren. Über diesen Weg erfolgt die Aktivierung des WAVE-1 Komplexes, welcher seinerseits die katalytische Aktivität des Arp2/3 Komplexes stimuliert und somit die für die Ausbildung von Lamellipodien erforderliche Aktinpolymerisation begünstigt. Gleichzeitig synthetisiert die aktivierte PI3K PIP3, wodurch Lpd und damit assoziierte Faktoren wie zum Beispiel das Ena/VASP Protein Mena an die Zellmembran rekrutiert werden. Dieser Prozess verstärkt die Rate der Aktinpolymerisation und erhöht somit die Wachstumsgeschwindigkeit von Lamellipodien, → Interaktion, Aktivierung.

4.2.2 Die MEGAP-SH3 Domäne vermittelt die Bindung von MEGAP an Lamellipodin

Die ersten Hinweise auf eine Assoziation zwischen MEGAP und Lpd waren die Ergebnisse eines GST-Pulldowns mit der MEGAP-SH3 Domäne und HEK293 Zellextrakten. Hierbei wurden sowohl Lpd als auch mDia1 zusammen mit der MEGAP-SH3 Domäne präzipitiert (Dr. Volker Endris, unveröffentlichte Daten). Da MEGAP hauptsächlich im zentralen Nervensystem eine wichtige Rolle einnimmt (Endris *et al.*, 2002; Soderling *et al.*, 2007), wurde gezielt nach MEGAP-bindenden Proteinen gesucht, die in Neuronen exprimiert werden. Im Gegensatz zu mDia1 konnte die Bindung von Lpd an die MEGAP-SH3 Domäne auch auf neuronaler Ebene gezeigt werden.

Im Anschluss an die GST-Pulldown Experimente erfolgte die Verifizierung der Interaktion zwischen MEGAP und Lpd mit Hilfe von Co-IP Studien. Sowohl unter Überexpression von MEGAP und Lpd in HEK293 Zellen als auch mit der Co-IP endogen exprimierter Proteine aus embryonalen Kortexneuronen konnte eine Interaktion zwischen MEGAP und Lpd aufgezeigt werden. Ähnlich der Bindung von MEGAP an WAVE-1 (Soderling *et al.*, 2002; Endris *et al.*, 2009) wurde hier dargelegt, dass dessen Assoziation mit Lpd von einer intakten MEGAP-SH3 Domäne abhängt. Die direkte Interaktion zwischen MEGAP und WAVE-1 wird durch die Phosphorylierung eines Tyrosinrestes innerhalb der MEGAP-SH3 Domäne reguliert. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Protein-Tyrosin-Kinase c-Abl, welche in die Signaltransduktion von WAVE-1 und Robo1 eingebunden ist (Bashaw *et al.*, 2000; Westphal *et al.*, 2000), direkt mit MEGAP interagiert und den Tyrosinrest Y755 der MEGAP-SH3 Domäne phosphoryliert. Der Phosphorylierungsstatus von Y755 beeinflusst nicht nur die Bindung von MEGAP an WAVE-1 sondern auch dessen raumzeitliche zelluläre Lokalisation (Endris *et al.*, 2009).

Da die Kinase c-Abl den AS-Rest Y755 der MEGAP-SH3 Domäne phosphorylieren kann, ist anzunehmen, dass dessen Aktivierung auch die Interaktion zwischen MEGAP und Lpd beeinflusst. In Fibroblasten erfolgt die Aktivierung von c-Abl zum Beispiel über die Signaltransduktion des Wachstumsfaktors PDGF (Plattner *et al.*, 1999), welcher die Ausbildung von Lamellipodien induziert (Hedberg *et al.*, 1993).

Im Rahmen des GST-Pulldowns mit adultem Mausgehirn wurde bei Lpd eine Phosphorylierung des Serinrestes 899 detektiert. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Modifizierung der Interaktion zwischen MEGAP und Lpd aufgrund von Phosphorylierungen nicht auf MEGAP beschränkt ist.

Obgleich gezeigt werden konnte, dass die Interaktion zwischen MEGAP und Lpd über die MEGAP-SH3 Domäne erfolgt, bleibt immer noch die Frage offen, welche Domäne von Lpd an das MEGAP-Protein bindet. Das ca. 200 kDa große Protein Lpd besitzt im N-terminalen Bereich eine RA-Domäne („Ras association domain") und die daran anschließende PH-Domäne, durch dessen Interaktion mit PIP3 Lpd an die Migrationsfront von Lamellipodien rekrutiert wird. In der C-terminalen Hälfte von Lpd befinden sich mehrere Prolin-reiche Regionen, welche Bindungsstellen für Profilin darstellen sowie mit der EVH1-Domäne der Ena/VASP Proteine interagieren (vgl. Abbildung 37) (Krause *et al.*, 2004). Des Weiteren wurden mehrere putative Bindungsstellen für SH3-Domänen postuliert, die sich über den gesamten C-Terminus verteilen. Somit besteht die Möglichkeit, dass MEGAP entweder mit einer oder mehreren der SH3-Bindungsstellen interagiert oder mit Profilin um dessen Bindungsstelle konkurriert. Letztere Situation würde eine Parallele zur putativen Interaktion zwischen MEGAP und mDia1 herstellen.

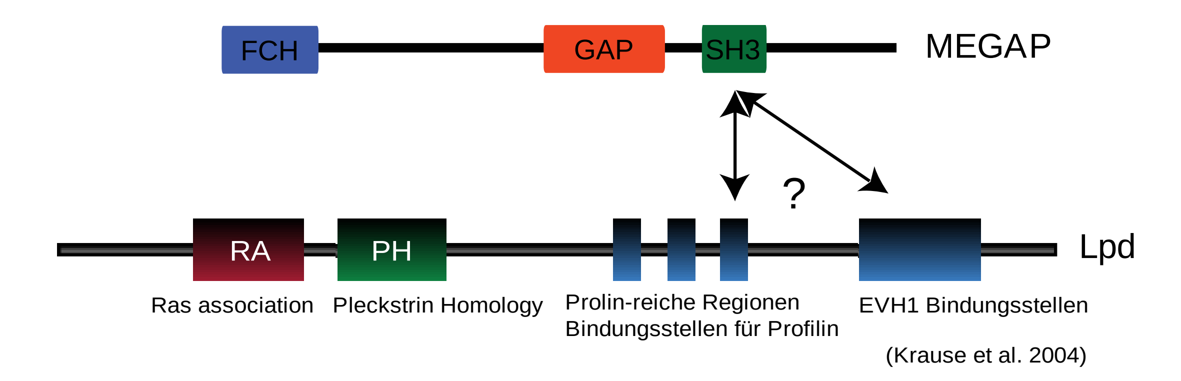


Abbildung 37: Lpd Domänenstruktur und die Interaktion mit MEGAP. Die MEGAP-SH3 Domäne ist essentiell für die Interaktion zwischen MEGAP und Lpd. Welche der Prolin-reichen Regionen des Lpd-Proteins an MEGAP bindet, ist derzeit noch nicht bekannt. Die dargestellten Proteindomänen entsprechen nicht den genauen Größenverhältnissen. FCH - Fes/CIP4 homology domain; GAP – GTPase activating (protein) domain; SH3 - Src homology 3 domain; RA –Ras association domain ; PH – Pleckstrin homology domain; EVH1 - Ena/VASP homology 1 domain.

4.2.3 Die MEGAP-abhängige Assoziation von Lamellipodin an Fokale Adhäsionen inhibiert die Zellmotilität

Die Beteiligung von SH3-Domänen an Protein-Protein Interaktionen ist ein weit verbreitetes Motiv innerhalb von Signaltransduktionskaskaden (Li, 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die MEGAP-SH3 Domäne als ein Bindeglied zwischen Signalkomplexen an der Zellmembran, dem Aktinzytoskelett sowie Fokalen Adhäsionen fungiert. Diese Annahme wird durch das Ergebnis gestützt, dass die Mutation des

Tyrosinrestes Y755 nicht nur die Interaktion zwischen MEGAP und Lpd stört, sondern auch die Lokalisierung beider Proteine an Fokale Adhäsionen unterbindet. Mit hoher Wahrscheinlichkeit vermittelt die MEGAP-SH3 Domäne die Bindung von MEGAP an die Proteine der Fokalen Adhäsionen.

In Abwesenheit von MEGAP wird Lpd in Fibroblasten nicht an Fokalen Adhäsionen detektiert. Im Gegensatz dazu ist bei den Ena/VASP Proteinen bekannt, dass sie über die Interaktion mit FPPPP Motiven in Zyxin und Vinculin gezielt an Fokale Adhäsionen geleitet werden (Gertler *et al.*, 1996; Drees *et al.*, 2000). Dennoch wirkt sich die Bindung von Lpd an die Mitglieder der Ena/VASP Familie nicht auf dessen zelluläre Lokalisation aus (Krause *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Lpd durch die Interaktion mit MEGAP von der Migrationsfront entfernt und an Fokale Adhäsionen umgelagert wird (vgl. Abbildung 38). Dies weist auf eine Veränderung der Funktionalität des Lpd-Proteins hin.

Um den Einfluss von MEGAP auf Lpd-bezogene Aktin-Dynamiken zu beurteilen, wurden lamellipodiale Wachstumsgeschwindigkeiten in Fibroblasten unter der Expression von MEGAP und Lpd quantifiziert. Hierbei musste zwischen den Auswirkungen von MEGAP auf die Rac1/WAVE-1- bzw. auf die Lpd-vermittelte Regulation von Aktin-Dynamiken unterschieden werden. Zu diesem Zweck wurde zusätzlich eine GAP-defiziente MEGAP Variante eingesetzt, um die durch MEGAP verursachten Veränderungen der Lamellipodien-Dynamik zu studieren. Da die GAP-Mutante MEGAP-RI im Vergleich zu den EYFP-transfizierten Kontrollzellen ähnliche lamellipodiale Wachstumsgeschwindigkeiten aufgewiesen hat, war die Aktivierung von Rac1 und des WAVE-1 Komplexes vermutlich nicht behindert. Dennoch unterdrückte die Co-Expression von MEGAP-RI und Lpd die stimulierenden Effekte von Lpd auf lamellipodiale Wachstumsgeschwindigkeiten sowie auf die Umfänge auswachsender Lamellipodien. Basierend auf diesen Ergebnissen kann angenommen werden, dass die Lpd-vermittelten Aktin-Dynamiken aufgrund der Interaktion zwischen MEGAP und Lpd gehemmt werden. Die Inhibierung von Lpd erfolgt wahrscheinlich über die Assoziation mit MEGAP und die damit verbundene Umlagerung an Fokale Adhäsionen. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass der Verlust der Interaktion zwischen MEGAP und Lpd trotz der verbleibenden GAP-Aktivität des MEGAP-Proteins die Ausbildung kleiner Lamellipodien ermöglicht und sich Lamellipodin in den auswachsenden Membranfortsätzen anreichert.

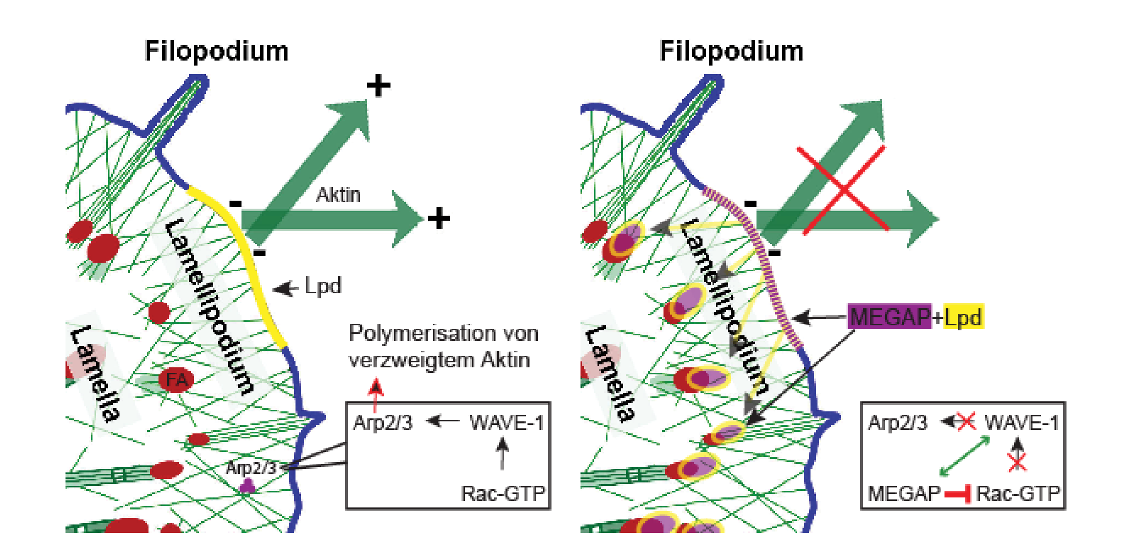


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Inhibierung von Lamellipodien durch MEGAP (rechts). Mit Hilfe seiner GAP-Aktivität und über die Interaktion mit WAVE-1 hemmt MEGAP die Aktivierung des Arp2/3 Komplexes (Endris *et al.*, 2002; Soderling *et al.*, 2002). Zusätzlich bewirkt MEGAP die Umlagerung von Lpd an Fokale Adhäsionen und unterbindet somit dessen Stimulierung der Aktinpolymerisation an der Zellmembran, FA – Fokale Adhäsion.

4.2.4 Verknüpfungen zwischen der Signaltransduktion von MEGAP und Lamellipodin

Die Analyse der Lamellipodien-Dynamik in den NIH-3T3 Fibroblasten hat die Einbindung von MEGAP in die PDGF-induzierten Signalkaskaden demonstriert. Über die Inhibierung von Rac1 und WAVE-1 unterbindet MEGAP die Arp2/3-vermittelte Aktinpolymerisation (Endris *et al.*, 2002; Soderling *et al.*, 2002). Die neu entdeckte Interaktion zwischen MEGAP und Lpd stellt möglicherweise auch einen Verknüpfungspunkt zwischen Lpd und WAVE-1 dar (Abbildung 39A). Die Integration von MEGAP, WAVE-1 und Lpd in einen Multiproteinkomplex wäre auch mit den Ergebnissen früherer Studien vereinbar, bei welchen Lpd in Proteinkomplexen identifiziert wurde, die sowohl das Ena/VASP Protein Mena als auch WAVE-1 enthielten (Salazar *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der inhibierende Einfluss von MEGAP auf die Aktin-Dynamiken an der Zellmembran nicht nur über die Inhibierung von Rac1 und WAVE-1 (Endris *et al.*, 2002; Soderling *et al.*, 2002) sondern auch über die Interaktion mit Lpd erfolgt. Sowohl die Bindung von MEGAP an WAVE-1 (Endris *et al.*, 2009) als auch an Lpd wird über die Phosphorylierung des Tyrosinrestes Y755 reguliert. Demzufolge ist anzunehmen, dass die Aktivierung der Proteinkinase c-Abl und dessen Assoziation mit MEGAP zu einer partiellen oder vollständigen Dissoziation des MEGAP-Proteins von Lpd und WAVE-1 führt.

In dieser Konstellation wären beide Proteine von ihrer Inhibierung durch MEGAP befreit und könnten die Ausbildung von Lamellipodien stimulieren (Abbildung 39B).

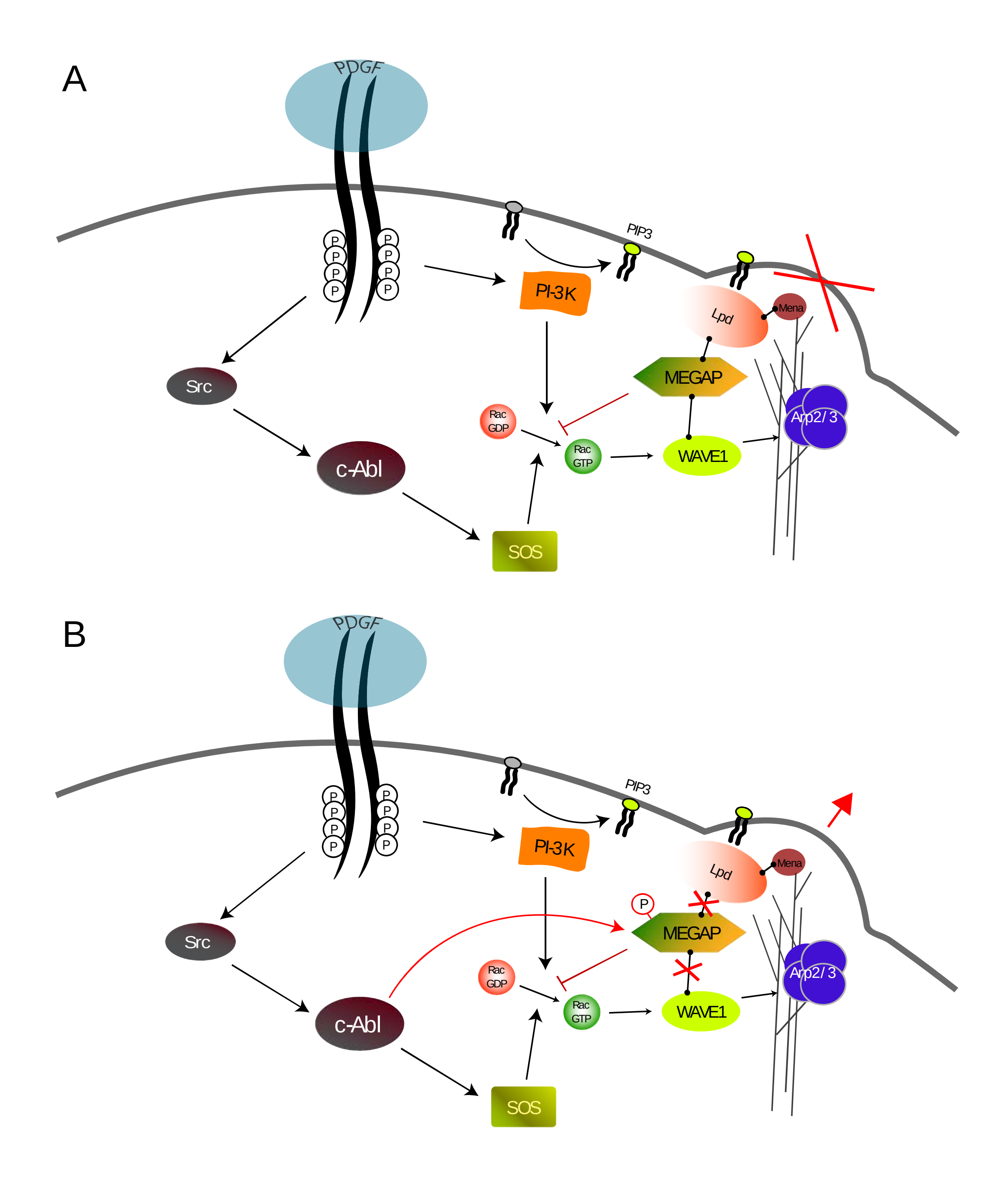


Abbildung 39: Einbindung von MEGAP in die PDGF-Signaltransduktion. A) Mit Hilfe seiner Rac1-spezifischen GAP-Aktivität und den Interaktionen zu WAVE-1 und Lpd inhibiert MEGAP die Arp2/3-vermittelte Aktinpolymerisation. **B)** Über die Bindung von PDGF wird die Proteinkinase c-Abl aktiviert, welche MEGAP u.a. an Position Y755 phosphorylieren kann. Dies führt wahrscheinlich zur Aufhebung der Bindung von MEGAP an Lpd und WAVE-1 und ermöglicht somit die Ausbildung von Lamellipodien. → Interaktion, Aktivierung; —| Interaktion, Inhibierung; •—• Interaktion; P – Phosphorylierung.

Unter Co-Expression von MEGAP (Wildtyp und GAP-Mutante) und Lpd in den NIH-3T3 Zellen wurde auch nach der Stimulierung durch PDGF vorrangig eine Hemmung der Aktin-

Dynamiken beobachtet. Dieses Ergebnis wird vermutlich darauf zurückzuführen sein, dass unter Überexpression nur ein sehr geringer Teil von MEGAP durch endogen exprimiertes c-Abl oder weitere Proteinkinasen phosphoryliert wurde.

4.2.5 Bedeutung der Interaktion zwischen MEGAP und Lamellipodin auf neuronaler Ebene

Die aufgezeigte Interaktion zwischen MEGAP und Lpd sowie die gemeinsame Involvierung in die PDGF-vermittelte Signaltransduktion führte zu der Frage, ob beide Proteine auf neuronaler Ebene in ein und denselben Signaltransduktionsweg integriert sind oder ob sie jeweils verschiedene Funktionen in separaten Signalwegen einnehmen können.

MEGAP ist über die Interaktion mit dem Slit-Rezeptor Robo1 an der repulsiven Wegfindung von Wachstumskegeln beteiligt (Wong *et al.*, 2001) und wurde als Kandidatengen für schwerwiegende kognitive Defekte isoliert (Endris *et al.*, 2002). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der Interaktion zwischen MEGAP und dem WAVE-1 Komplex die dendritische Morphologie von Neuronen und die Signalübertragung an den Synapsen beeinflusst. Des Weiteren wurde bei den analysierten WAVE-1 Knockout-Mäusen eine Verhaltensänderung beobachtet (Soderling *et al.*, 2007). Daher vermitteln die Ergebnisse dieser Studie einen Einblick, wie der Verlust der MEGAP-Funktion zu kognitiven Defekten führen kann.

Lpd ist ebenfalls in die Slit/Robo-Signaltransduktion eingebunden. Im Fadenwurm Caenorhabditis Elegans (C. elegans) begünstigt MIG-10, ein Homolog von Lpd, die Wegfindung und das Auswachsen von Axonen als Antwort auf die Stimulierung durch die Signalmoleküle Slit und Netrin (Chang *et al.*, 2006; Quinn *et al.*, 2006). Die Mutation von MIG-10 verursacht u.a. ein fehlerhaftes Auswachsen der Axone von Motorneuronen und mechanosensorischen Neuronen in C. elegans. Demzufolge spielen sowohl MEGAP als auch Lpd eine wichtige Rolle in der Slit/Robo-vermittelten neuronalen Migration. Darüber hinaus fungiert MIG-10 zusammen mit dem Rac1 Homolog CED-10, um die Orientierung auswachsender Axone als Antwort auf die UNC-6/Netrin-vermittelte Signaltransduktion zu steuern (Quinn *et al.*, 2008). In Motorneuronen führt asymmetrisch aktiviertes Rac1-GTP zu einer asymmetrischen Rekrutierung von MIG-10 an die Zellmembran. Dies initiiert eine lokal verstärkte Aktinpolymerisation, welche für das gerichtete Auswachsen von Neuriten und für die Wegfindung von Wachstumskegeln benötigt wird. Somit stellen sowohl MEGAP als auch

Lpd Komponenten der Rac1-vermittelten Signaltransduktion dar, bei der MEGAP die Rolle eines Inhibitors für Lpd übernehmen könnte.

Zusätzlich zu den Studien, welche in C. elegans durchgeführt wurden, konnte in der Maus die Lokalisation von Lpd an der Migrationsfront von Wachstumskegeln hippokampaler Neuronen gezeigt werden (Krause *et al.*, 2004). In Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit kann die Hypothese aufgestellt werden, dass MEGAP während der Slit/Robo-vermittelten Repulsion von Axonen die Rekrutierung von Lpd an die Migrationsfront und somit auch die verstärkte Ausbildung von Membranfortsätzen unterbindet. Neben der Beteiligung an der repulsiven Wegfindung von Wachstumskegeln könnte eine Interaktion zwischen MEGAP und Lpd auch dazu dienen, dass entlang der neuronalen Fortsätze und an den neuronalen Zellkörpern keine zusätzlichen Lamellipodien gebildet werden.

4.3 Die Rolle von MEGAP während der Entwicklung des ZNS

Die Entwicklung des zentralen Nervenssystems (ZNS) stellt einen der ersten Prozesse im Verlauf der Embryogenese dar. Eine präzise Regulation der Migration neuronaler Vorläuferzellen und Neuronen mit anschließender Vernetzung der Nervenzellen ist wichtig für die komplexe Funktion des ZNS. Diese Prozesse werden durch eine Vielzahl von Signaltransduktionskaskaden gesteuert, welche u.a. die Organisation des Zytoskeletts kontrollieren. Aufgrund der Verknüpfungen zwischen den verschiedenen Signalwegen oder der zentralen Rolle bestimmter Faktoren kann bereits die Fehlfunktion eines einzigen Proteins globale Auswirkungen auf die Entwicklung des ZNS und damit verbundene kognitive Funktionen haben.

MEGAP wurde im Rahmen genetischer Analysen mental retardierter Patienten als ein Kandidatengen für geistige Behinderung identifiziert (Endris *et al.*, 2002). Eine Patientin, bei welcher *MEGAP* aufgrund einer balancierten *de novo* Translokation zwischen den Chromosomen X und 3 zerstört wurde, wies zusätzlich zu der schweren Beeinträchtigung ihrer kognitiven Funktionen auch motorische Defekte (Ataxie) sowie ein fehlendes Sprachvermögen auf. Der bisher am besten verstandene Signalweg, bei welchem MEGAP wichtige Funktionen einnimmt, ist die Slit/Robo-vermittelte repulsive Wegfindung von Axonen bzw. Wachstumskegeln. Über die Bindung des Slit-Liganden an den Robo-Rezeptor wird MEGAP mit hoher Wahrscheinlichkeit aktiviert und unterbindet anschließend die Polymerisation von verzweigtem Aktin.

Sowohl in dieser Arbeit als auch im Rahmen eines Expressionsvergleichs der Gene *srGAP1*, *srGAP2* und *srGAP3/Megap* (Bacon *et al.*, 2009) wurde eine starke Präsenz des *Megap* Transkripts in weiten Bereichen des sich entwickelnden ZNS in der Maus aufgezeigt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Expression von *Megap* bereits sehr früh im Verlauf der Embryogenese initiiert wird und insbesondere in stammzellreichen Regionen mit hohem Migrationspotential stattfindet. Des Weiteren wurde die *Megap* mRNA in den Hinterwurzelganglien sowie in den trigeminalen und inferialen Ganglien im Kopfbereich detektiert. Somit ist anzunehmen, dass MEGAP sowohl an der Migration neuronaler Zellkörper als auch an der Wegfindung von Axonen beteiligt ist. Interessanterweise grenzt sich die Expression von *Megap* bzw. *srGAP3* sowohl räumlich als auch zeitlich deutlich von den Expressionsmustern der anderen *srGAP*-Transkripte ab (Bacon *et al.*, 2009). Dies lässt vermuten, dass die einzelnen srGAPs verschiedene Funktionen im Verlauf der Entwicklung des ZNS einnehmen.

Im Rahmen der Expressionsstudien in dieser Arbeit wurde auch die Co-Expression von *Megap* und den Transkripten des Slit-Rezeptors *Robo1* wie auch von *Lpd* untersucht. Aufgrund der Einbindung in die Slit/Robo-vermittelte Signaltransduktion und der Interaktion zwischen MEGAP und Robo1 (Wong *et al.*, 2001) sowie zwischen MEGAP und Lpd wurde zumindest eine partielle Überlappung der Expressionsmuster erwartet. Eine Co-Expression mit der *Megap* mRNA konnte sowohl für *Robo1* als auch für *Lpd* gezeigt werden. Jedoch wurden auch Bereiche identifiziert, welche die Co-Expression von *Megap* und *Lpd* aber nicht die Expression von *Robo1* aufwiesen. Ein interessantes Beispiel stellen hier die trigeminalen Ganglien dar. Diese Strukturen beinhalten während der embryonalen Entwicklung sowohl neuronale Zellkörper als auch die Fortsätze von Nervenzellen. Da *Megap* und *Robo1* in den trigeminalen Ganglien nicht co-exprimiert werden, ist hier die Einbindung von MEGAP und Lpd in Robo1-unabhängige Signalwege sehr wahrscheinlich.

Im ZNS der Säugetiere werden neben Robo1 zwei weitere Slit-Rezeptoren der Robo-Familie exprimiert, Robo2 und das auch als Rig-1 bezeichnete Protein Robo3 (Dickson and Gilestro, 2006). Ähnlich der Funktion von Robo1 wird Robo2 verstärkt in Axonen nach dem Überqueren der Mittellinie exprimiert, so dass diese die Mittellinie nicht ein zweites Mal kreuzen (Long *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu wurde die Expression von Robo3 in Axonen vor dem Überqueren der Mittellinie detektiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Robo3 die Sensitivität von Axonen gegenüber den Slits unterdrückt, wodurch das Überqueren der Mittellinie ermöglicht wird (Sabatier *et al.*, 2004). Aufgrund der Tatsache, dass MEGAP nicht nur mit Robo1 sondern auch mit Robo2 und Robo3 interagiert (Dr.

Volker Endris, unveröffentlichte Daten), wäre eine Beteiligung von MEGAP und Lpd an den Signalwegen von Robo2 und Robo3 vorstellbar.

Wie bereits im Zusammenhang mit MEGAP- bzw. Lpd-bezogenen Signalwegen diskutiert wurde, stellt MEGAP vermutlich einen Inhibitor für Lpd dar. Die asymmetrische Ausbildung von Lamellipodien im Wachstumskegel ist sowohl für die Wegfindung von Axonen als auch für die neuronale Migration erforderlich. Demnach könnte das Zusammenspiel von MEGAP und Lpd nicht nur beim Überqueren der Mittellinie sondern zum Beispiel auch bei der Generierung gerichteter Migrationsströme von neuronalen Vorläuferzellen und Neuronen eine wichtige Rolle einnehmen.

Um die Rolle von MEGAP bezüglich der Entwicklung des ZNS genauer zu untersuchen, wurde im Rahmen einer Kooperation mit der Gruppe von Prof. Dr. Dusan Bartsch (Zentralinstitut für Seelische Gesundheit, Mannheim) eine Megap Knockout-Maus (*Megap*-/-) generiert, welche ein *Megap* Transkript mit einem vorzeitigen Stoppkodon nach Exon 3 exprimiert. Mit Hilfe der *Megap* Knockout-Maus soll zum Beispiel untersucht werden, wie genau Megap die Migration neuronaler Vorläuferzellen und Axonen beeinflusst, welche neuronalen Subpopulationen und damit verbundene Migrationsereignisse besonders von einem intakten Megap-Protein abhängig sind und wie sich die Abwesenheit von Megap auf das Verhalten und kognitive Funktionen auswirkt.

Erste Daten weisen darauf hin, dass die *Megap* defizienten Mäuse neben einer verringerten Überlebensrate während der Embryonalentwicklung reduzierte Aktivitäten am Tag sowie eine erhöhte Ängstlichkeit aufzeigen (Waltereit *et al.*, 2008b). Des Weiteren konnte in den Primärkulturen hippokampaler Megap -/- Neuronen sowohl an den neuronalen Zellkörpern als auch entlang der Axone eine verstärkte Ausbildung von Lamellipodien beobachtet werden (Dr. Volker Endris, unveröffentlichte Daten). Dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass MEGAP auch in Neuronen die Funktion von Lpd gezielt inhibiert.

4.4 Ausblick

Die Charakterisierung der Interaktion zwischen MEGAP und Lpd hat den hemmenden Effekt von MEGAP auf die Lpd-bezogene Lamellipodien-Dynamik in Mausfibroblasten aufgezeigt. Um weitere Einblicke in die damit verbundenen Signalwege zu erhalten, wäre es hilfreich, die Proteindomäne von Lpd zu identifizieren, welche mit MEGAP interagiert. So könnten weitere Analysen auch gezielt mit Lpd-Mutanten durchgeführt werden, die zum Beispiel nicht mehr

mit MEGAP interagieren und sich dadurch vielleicht auch der Inhibierung durch MEGAP entziehen.

Ein weiterer wichtiger Punkt für die Analyse der funktionellen Korrelation zwischen MEGAP und Lpd wäre der Wechsel zu einem Modellsystem, in dem MEGAP und Lpd endogen co-exprimiert werden. Dies könnte zum Beispiel über die Verwendung der Neuroblastoma Zelllinie N1E-115 (Pertz *et al.*, 2008) erfolgen, in welcher mit Hilfe von miRNAs bzw. RNA-Interferenztechnologien die Expression von MEGAP oder Lpd gezielt unterdrückt werden könnte. Die dadurch verursachten Effekte in Bezug auf die Zellmotilität und die Ausbildung von Zellfortsätzen könnten für MEGAP und Lpd sowohl einzeln als auch kombiniert untersucht werden.

Des Weiteren bietet sich die Analyse der Megap -/- Neuronen an, um die Effekte von MEGAP auf die Lpd-vermittelte Lamellipodien-Dynamik auf neuronaler Ebene zu untersuchen. In diesem Zusammenhang stellt sich u.a. die Frage, ob die vermehrte Ausbildung von Lamellipodien in hippokampalen Megap -/- Neuronen auf die fehlende Inhibierung von Lpd durch Megap oder auf die Abwesenheit der GAP-Aktivität von Megap zurückzuführen ist. Hier könnte ebenfalls die Unterdrückung der Lpd-Expression mit Hilfe von Lpd-spezifischen miRNAs aufschlussreich sein. Sollte die verstärkte Lamellipodienbildung in den Megap-defizienten Neuronen in Abwesenheit von Lpd nicht erfolgen, wäre dies eine weitere Bestätigung für die Rolle von MEGAP als Inhibitor von Lpd.

Insbesondere die veränderte Morphologie der hippokampalen Neuronen in Megap-defizienten Mäusen könnte einen Ansatzpunkt für die Erklärung von Erkrankungen wie geistiger Behinderung oder Autismus darstellen. Frühere Studien haben gezeigt, dass der Hippokampus ein wichtiges Zentrum für kognitive Funktionen wie das Lernen und die Erinnerung darstellt (Eichenbaum, 2004). In dieser Gehirnregion werden bis ins Erwachsenenalter hinein Neuronen geboren, welche über kurze Strecken innerhalb des Hippokampus migrieren (Ghashghaei *et al.*, 2007). Unter der Annahme, dass der Phänotyp der Megap-defizienten Mäuse u.a. durch die fehlende Bindung von MEGAP an Lpd verursacht wird, könnte die Assoziation zwischen beiden Proteinen nicht nur die neuronale Migration und die Wegfindung von Axonen während der Entwicklung des ZNS sondern auch die neuronale Plastizität im erwachsenen Organismus beeinflussen.

5 Anhang

5.1 Genotypen der verwendeten E.coli Bakterienstämme

XL2-Blue: endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB$^+$ lacI^q Δ(lacZ)M15 Amy Cm^R] hsdR17(r_K^- m_K^+)

DH5α: F$^-$ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169, hsdR17(r_K^- m_K^+), λ–

DH10B: F$^-$ endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ$^-$

DB3.1: F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r_B^-, m_B^-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^r) xyl5 Δleu mtl1

5.2 Hefestämme

MaV203™: MATα, leu2-3, 112, trp1-901, his3 Δ 200, ade2-101, cyh2R, can1R, gal4 Δ, gal80 Δ, HIS3UASGAL1::HIS3 LYS2, GAL1::lacZ, SPAL10::URA3

PJ696 Mata: trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ GAL2-ADE2 LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-lacZ

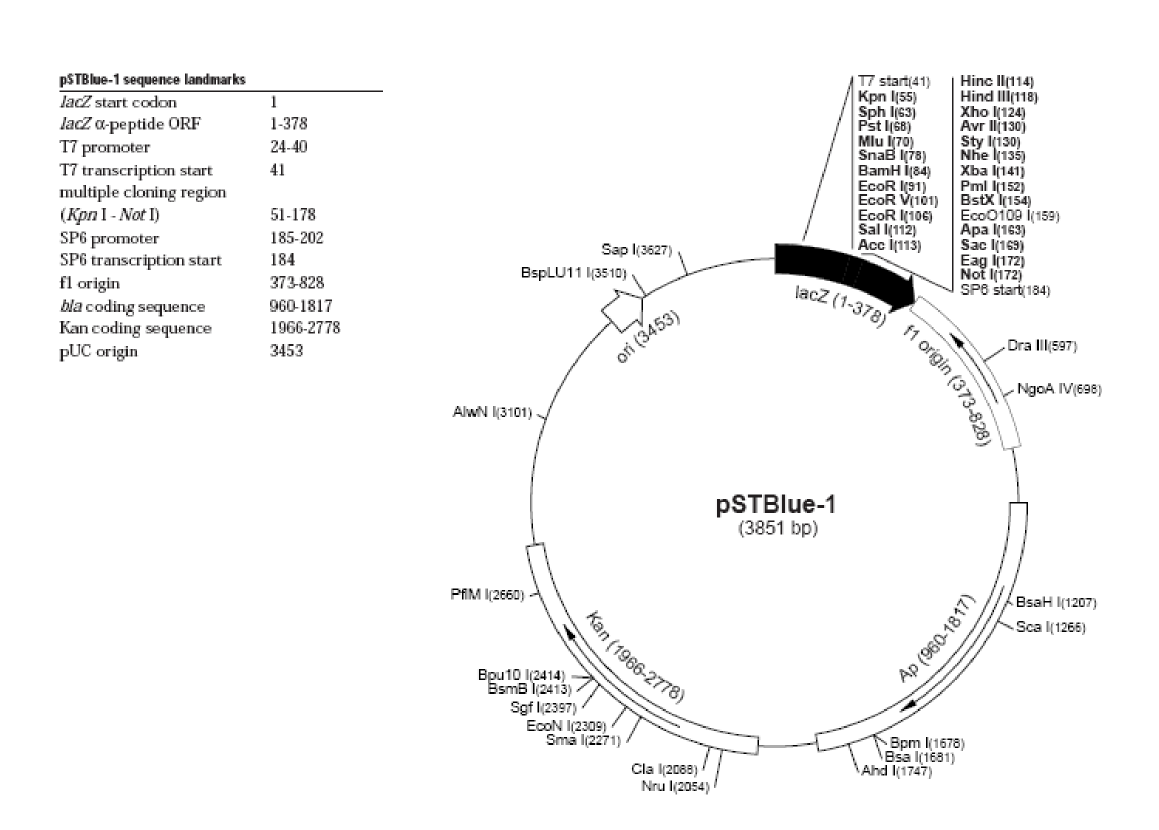
Kontrollstamm	*enthaltene Plasmide*	*cDNA-Insert*	*Interaktionsstärke*
A (Chevray and Nathans, 1992)	pPC97	Kein Insert	nicht vorhanden
	pPC86	Kein Insert	
B (Vidal et al., 1996)	pPC97-FB	humanes RB Acc# M28419 Aminosäuren 302-928	schwach
	pPC86-E2F1	humanes E2F1 Acc# M96577 Aminosäuren 342-437	
C (Du et al., 1996)	pPC97-CYH2-dDP	Drosophila DP Acc# X79708 Aminosäuren 1-377	mäßig stark
	pPC86-dE2F	Drosophila E2F Acc# U10184 Aminosäuren 225-433	
D (Chevray and Nathans, 1992)	pPC97-Fos	Ratten cFos Acc# X06769 Aminosäuren 132-211	stark

	pPC86-Jun	Maus cJun Acc# X12761 Aminosäuren 250-325	
E (Fields and Song, 1989)	pCL1 (encoding full length GAL4)	GAL4 Acc# K10486 Aminosäuren 1-881	sehr stark
	pPC86	Kein Insert	

Tabelle 12: Hefekontrollstämme A-E (*nach Invitrogen*); Die Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Hefekontrollstämme, die bei dem Yeast-Two-Hybrid Screen zur qualitativen Einschätzung der Interaktionsstärke der isolierten Bindungspartner eingesetzt wurden.

5.3 Vektorkarten und verwendete Konstrukte

5.3.1 pSTBlue-1



pSTBlue-1 sequence landmarks

lacZ start codon	1
lacZ α-peptide ORF	1-378
T7 promoter	24-40
T7 transcription start	41
multiple cloning region (*Kpn* I - *Not* I)	51-178
SP6 promoter	185-202
SP6 transcription start	184
f1 origin	373-828
bla coding sequence	960-1817
Kan coding sequence	1966-2778
pUC origin	3453

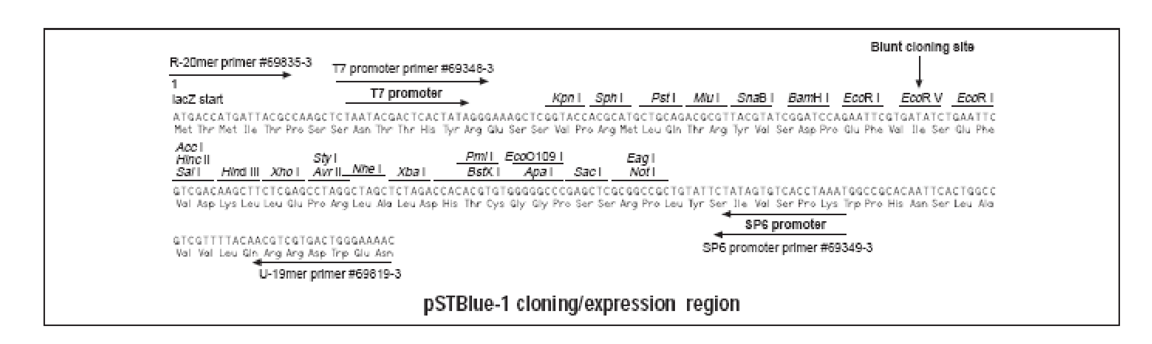


Abbildung 40: Vektorkarte pSTBlue-1 (*nach Novagen, Homepage, technical literature*)

Klonname	*Insert*	*Versuche*
pST-mMEGAP 25-30	MEGAP a/b Bp 2504-3010	RNA ISH
pST-mRobo1	Robo1 Bp 4071-4555	RNA ISH
pST-mLpd 267-827	Lpd BP 267-827	RNA ISH

5.3.2 pBluescript II SK-

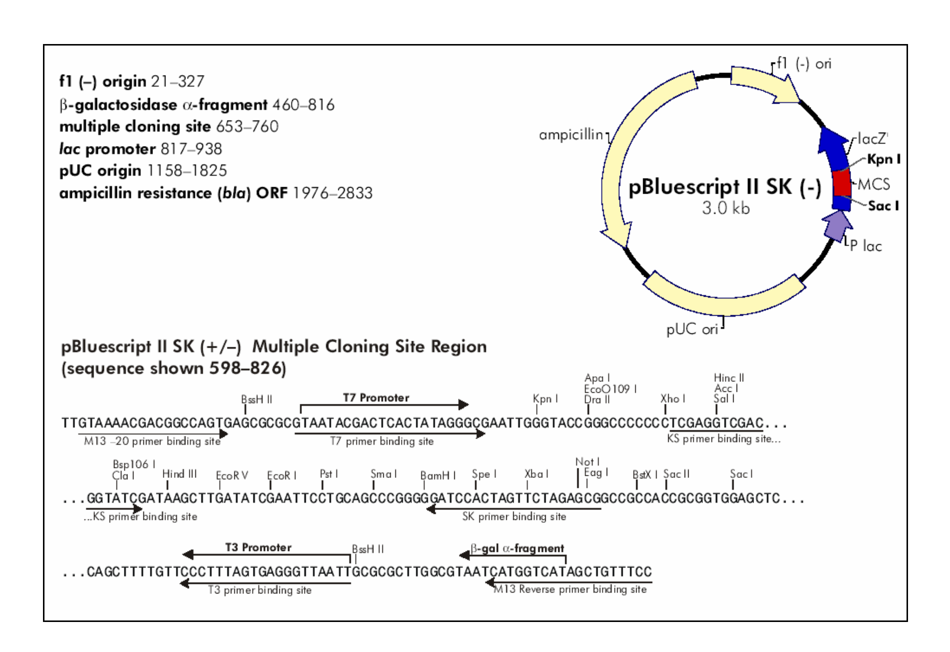


Abbildung 41: Vektorkarte pBluescript II SK(-) (*nach Stratagene, Homepage, Vector Maps & Sequences*)

Klonname	*Schnittstellen Vektor*	*Schnittstellen Insert*	*Insert*	*Bemerkung*
pBSII-Lamellipodin (full length)	BglII + SalI	BglII + SalI	Lamellipodin Bp Start-467	Vektor: KIAA1681 Insert: PCR aus IRAK p961;N1864 Q2 (Lpd)

5.3.3 pGEX4T

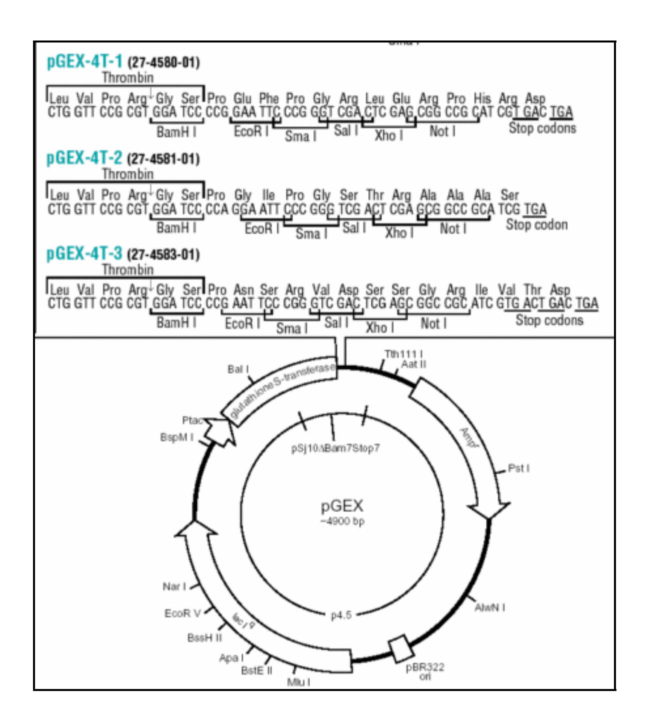


Abbildung 42: Vektorkarte pGEX Vektoren (*nach GE-Healthcare, Homepage, pGEX Vectors*)

Klonname	*Schnittstellen Vektor*	*Schnittstellen Insert*	*Insert*	*Versuch*
pGEX 22-26	EcoRI + XhoI	EcoRI + XhoI	MEGAP Bp 2288-2612	Proteinexpression GST-MEGAP-SH3

5.3.4 pcDNA3.1

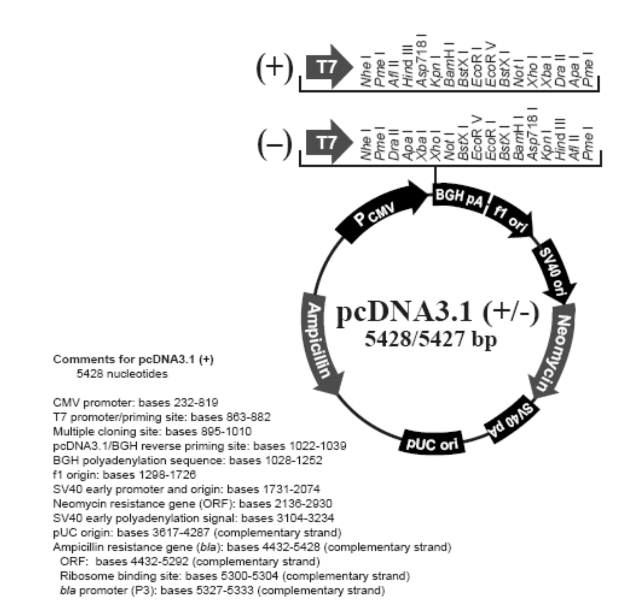


Abbildung 43: Vektorkarte pcDNA3.1 (*nach Invitrogen, Homepage, Vector Maps*)

Klonname	Schnittstellen Vektor	Schnittstellen Insert	Insert	Versuch
pcDNA3.1-MEGAPa	EcoRI + XbaI	EcoRI + XbaI	MEGAPa	Co-IP
pcDNA3.1-MEGAPa-W781A	EcoRI + XbaI	EcoRI + XbaI	MEGAPa-W781A	Co-IP

5.3.5 pcDNA4/TO/mycHis/C

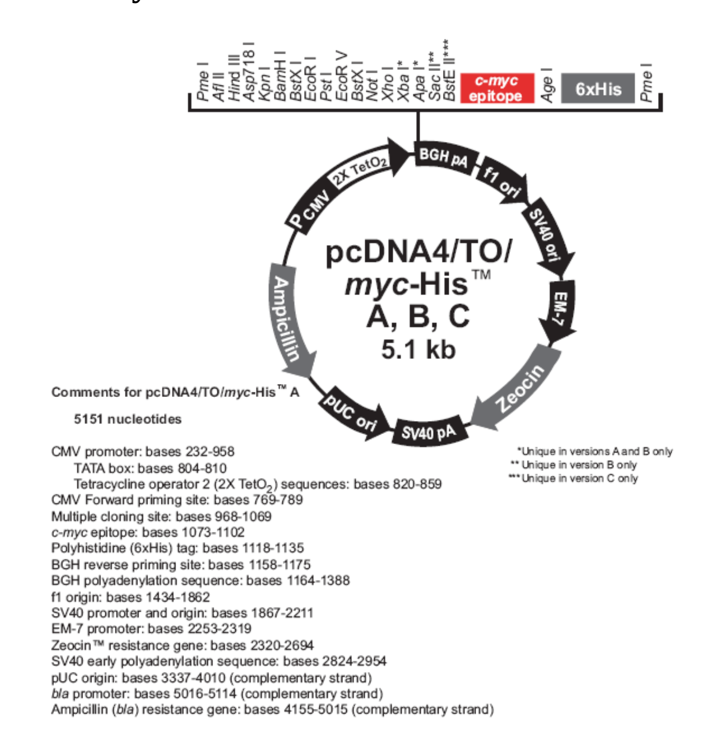
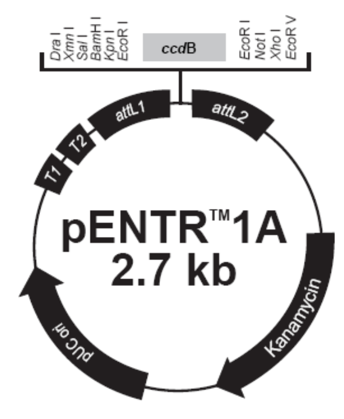


Abbildung 44: Vektorkarte pcDNA4/TO/*myc*-His, (*nach Invitrogen, Homepage, Vector Maps*)

Klonname	Schnittstellen Vektor	Schnittstellen Insert	Insert	Versuch
TO-MEGAPa-EYFP fl	EcoRI + NotI DraIII + NotI	EcoRI + NotI DraIII + NotI	MEGAPa fl EYFP fl	IF, live cell imaging
TO-MEGAPa-R542I-EYFP	EcoRI + NotI DraIII + NotI	EcoRI + NotI DraIII + NotI	MEGAPa-R542I fl EYFP fl	IF, live cell imaging
TO-Robo1	BspEI + XbaI	BspEI + AvrII	Robo1 fl	GST-Pulldown

5.3.6 pENTR1A



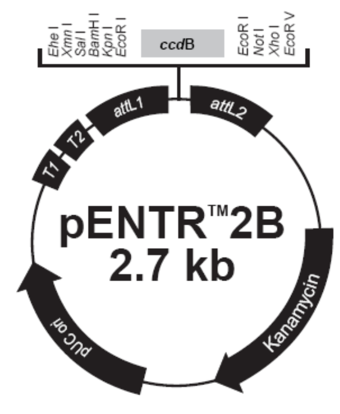
Comments for pENTR™1A
2717 nucleotides

*rrn*B T1 transcription termination sequence: bases 106-149
*rrn*B T2 transcription termination sequence: bases 281-308
*att*L1: bases 358-457 (complementary strand)
*ccd*B gene: bases 612-917
*att*L2: bases 946-1045
Kanamycin resistance gene: bases 1168-1977
pUC origin: bases 2041-2714

Abbildung 45: Vektorkarte pENTR1A, (*nach Invitrogen, Homepage, Vector Maps*)

Klonname	*Schnittstellen Vektor*	*Schnittstellen Insert*	*Insert*	*Bemerkung*
pENTR-Lpd	SalI + EcoRI	SalI + EcoRI	Lamellipodin Start-tga	aus pBSII-Lpd
pENTR-mCherry-Lpd	DraI + SalI	DraI + SalI	mCherry	aus pENTR-Lpd

5.3.7 pENTR2B



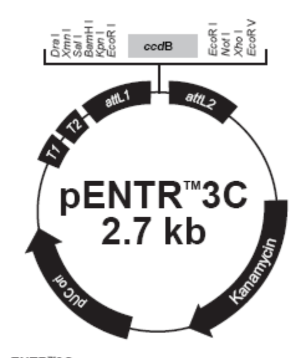
Comments for pENTR™2B
2718 nucleotides

*rrn*B T1 transcription termination sequence: bases 106-149
*rrn*B T2 transcription termination sequence: bases 281-308
*att*L1: bases 358-457 (complementary strand)
*ccd*B gene: bases 613-918
*att*L2: bases 947-1046
Kanamycin resistance gene: bases 1169-1978
pUC origin: bases 2042-2715

Abbildung 46: Vektorkarte pENTR2B, (*nach Invitrogen, Homepage, Vector Maps*)

Klonname	Schnittstellen Vektor	Schnittstellen Insert	Insert
pENTR-MEGAP-C	KpnI + NotI	KpnI + NotI	MEGAP Bp 2052-tga
pENTR-MEGAP-SH3/KID	EcoRI + XhoI	EcoRI + XhoI	MEGAP Bp 2288-3010
pENTR-Robo1-CC3	EcoRI + NotI	EcoRI + NotI	Robo1-CC3 Bp 4368-4885

5.3.8 pENTR3C



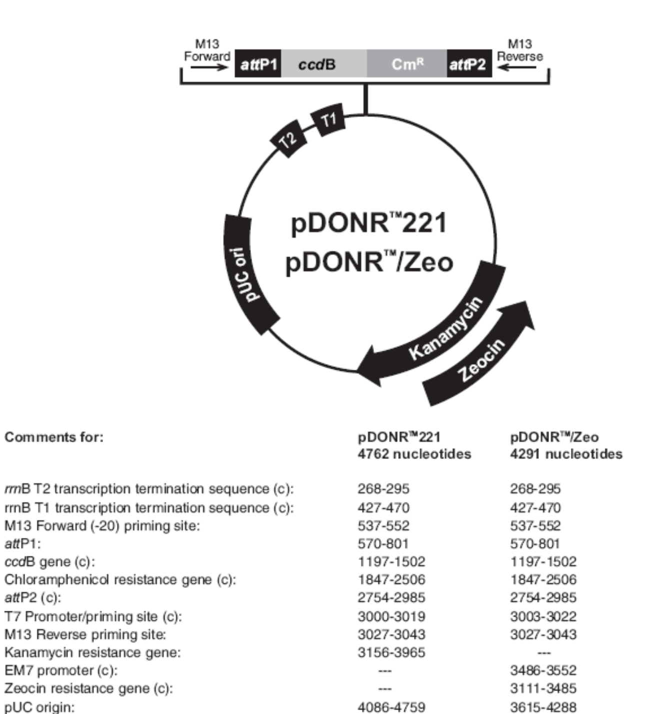
Comments for pENTR™3C
2723 nucleotides

*rrn*B T1 transcription termination sequence: bases 106-149
*rrn*B T2 transcription termination sequence: bases 281-308
*att*L1: bases 358-457 (complementary strand)
*ccd*B gene: bases 618-923
*att*L2: bases 952-1051
Kanamycin resistance gene: bases 1174-1983
pUC origin: bases 2047-2720

Abbildung 47: Vektorkarte pENTR3C,(*nach Invitrogen, Homepage, Vector Maps*)

Klonname	Schnittstellen Vektor	Schnittstellen Insert	Insert	Bemerkung
pENTR-MEGAPa	EcoRI + XhoI	EcoRI + XhoI	MEGAPa fl	
pENTR-MEGAPa-Y755D	EcoRI + XhoI	EcoRI + XhoI	MEGAPa fl	Mutation Y755D

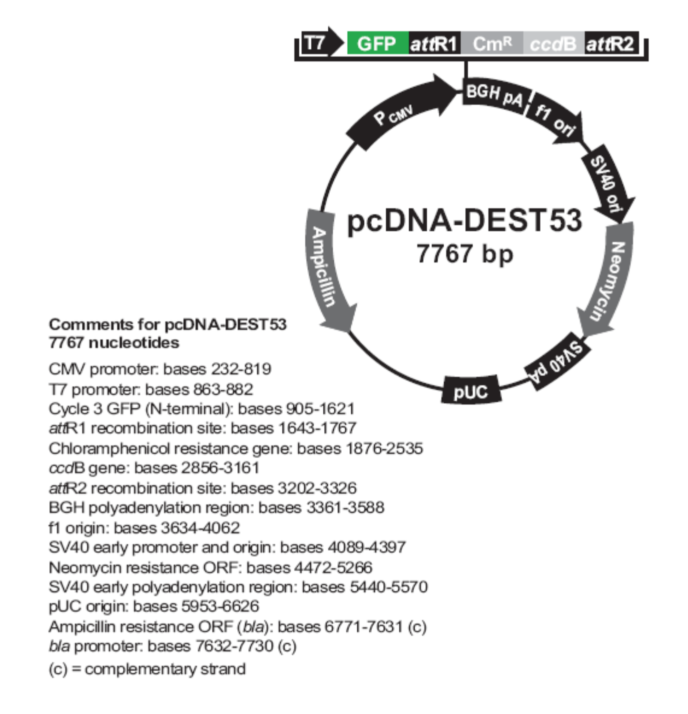
5.3.9 pDONR221



Comments for:	pDONR™221 4762 nucleotides	pDONR™/Zeo 4291 nucleotides
*rrn*B T2 transcription termination sequence (c):	268-295	268-295
rrnB T1 transcription termination sequence (c):	427-470	427-470
M13 Forward (-20) priming site:	537-552	537-552
*att*P1:	570-801	570-801
*ccd*B gene (c):	1197-1502	1197-1502
Chloramphenicol resistance gene (c):	1847-2506	1847-2506
*att*P2 (c):	2754-2985	2754-2985
T7 Promoter/priming site (c):	3000-3019	3003-3022
M13 Reverse priming site:	3027-3043	3027-3043
Kanamycin resistance gene:	3156-3965	---
EM7 promoter (c):	---	3486-3552
Zeocin resistance gene (c):	---	3111-3485
pUC origin:	4086-4759	3615-4288

Abbildung 48: Vektorkarte pDONR221, (*nach Invitrogen, Homepage, Vector Maps*)

5.3.10 pcDNA-DEST53



Comments for pcDNA-DEST53
7767 nucleotides

CMV promoter: bases 232-819
T7 promoter: bases 863-882
Cycle 3 GFP (N-terminal): bases 905-1621
*att*R1 recombination site: bases 1643-1767
Chloramphenicol resistance gene: bases 1876-2535
*ccd*B gene: bases 2856-3161
*att*R2 recombination site: bases 3202-3326
BGH polyadenylation region: bases 3361-3588
f1 origin: bases 3634-4062
SV40 early promoter and origin: bases 4089-4397
Neomycin resistance ORF: bases 4472-5266
SV40 early polyadenylation region: bases 5440-5570
pUC origin: bases 5953-6626
Ampicillin resistance ORF (*bla*): bases 6771-7631 (c)
bla promoter: bases 7632-7730 (c)
(c) = complementary strand

Abbildung 49: Vektorkarte pcDNA-DEST53, (*nach Invitrogen, Homepage, Vector Maps*)

5.3.11 pDEST22

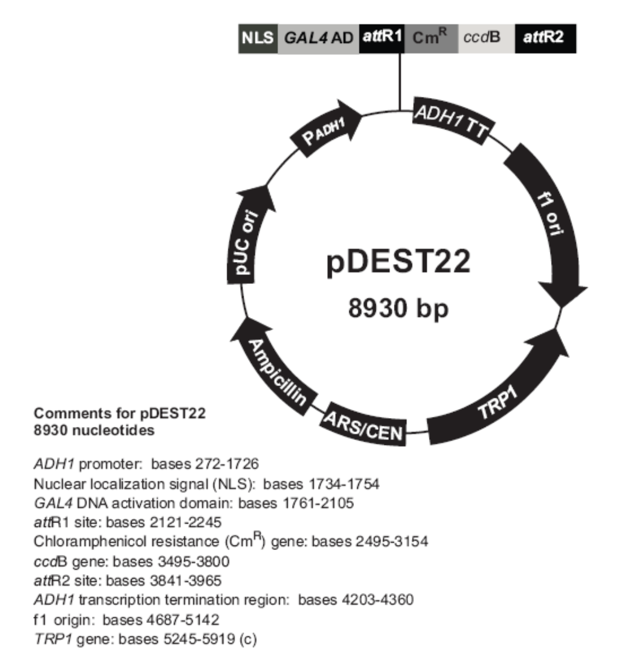


Abbildung 50: Vektorkarte pDEST22 (*nach Invitrogen, Homepage, Vector Maps*)

5.3.12 pDEST32

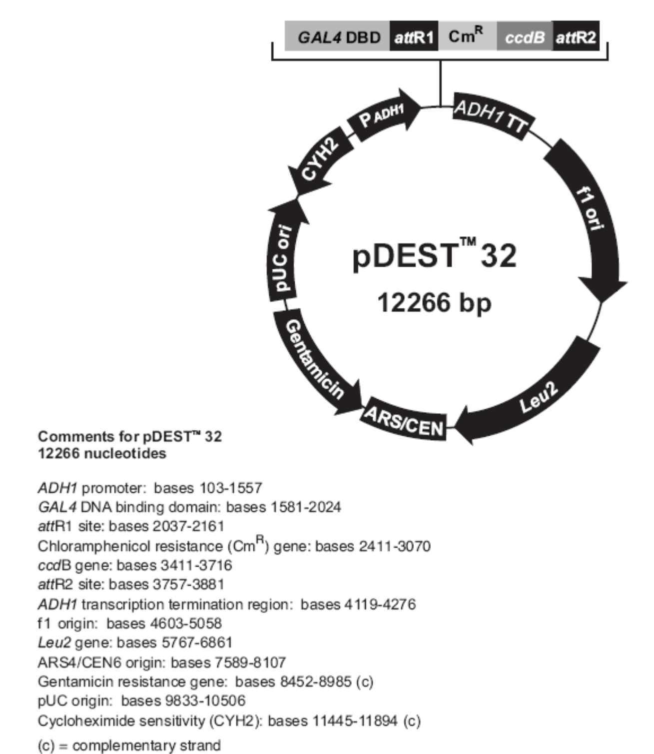


Abbildung 51: Vektorkarte pDEST32 (*nach Invitrogen, Homepage, Vector Maps*)

5.3.13 pDEST12.2

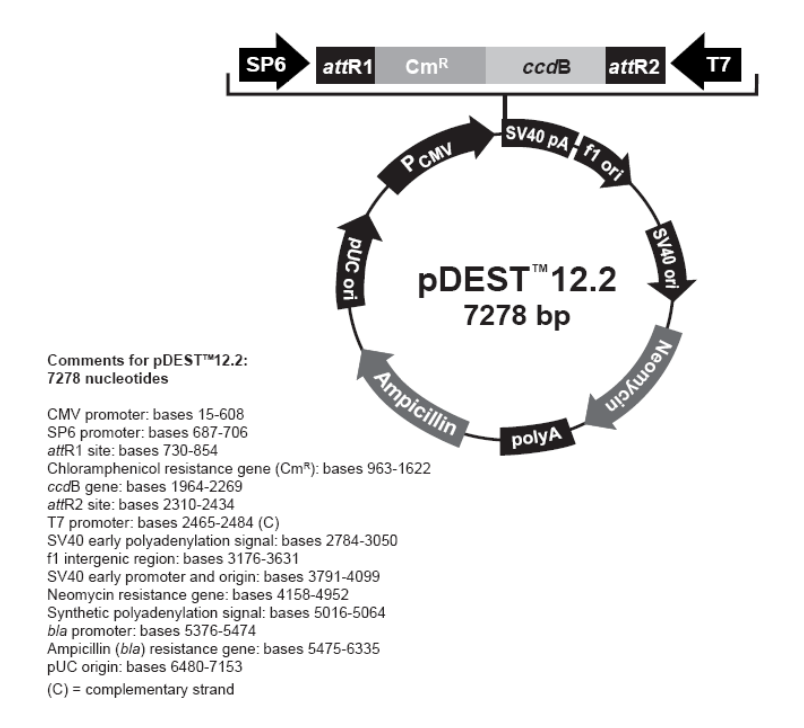


Abbildung 52: Vektorkarte pDEST12.2 (*nach Invitrogen, Homepage, Vector Maps*)

5.3.14 bestellte Klone

Lamellipodin: KIAA1681 (Kazusa DNA Research Institute)

mDia1: mKIAA4062 (Kazusa DNA Research Institute)

5.4 Sequenzen der cDNA-Klone (Yeast-Two-Hybrid Screen, 3.2.1)

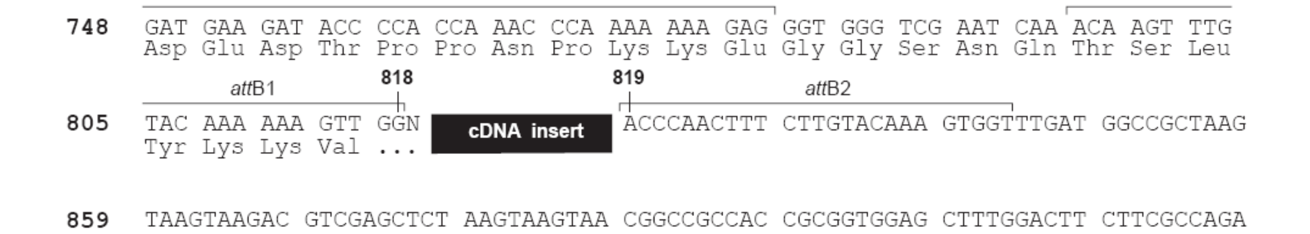


Abbildung 53: Sequenzausschnitt der Klonierungsstelle des pEXP-AD22 Vektors für die Generierung der cDNA-Bibliothek. Für eine korrekte Expression des Fusionsproteins musste der Leserahmen des Vektors mit dem Leserahmen des cDNA-Inserts übereinstimmen.

Der Expressionsvektor pEXP-AD22 wurde für die Herstellung der humanen fötalen Gehirn cDNA-Bibliothek eingesetzt. Die in diesem Abschnitt angegebenen Sequenzen der identifizierten Klone stammen aus der Datenbank des NCBI. In grün bzw. rot sind Start- und Stoppkodon des jeweiligen Transkripts angegeben. Die gelb unterlegten Sequenzbereiche geben den Anfang der im cDNA-Klon enthaltenen Sequenz an. Die mit roter Schrift markierten Tripletts zeigen vorzeitig generierte Stoppkodons an, welche durch Verschiebung des Leserasters entstanden sind. Aufgrund der Tatsache, dass im Verlauf des Screens alle selektierten Klone als falsch positiv bewertet wurden, sind die 3'-Enden der in den Klonen enthaltenen cDNA-Sequenz nicht ermittelt worden.

>gi|28411187|emb|AJ544537.1| Homo sapiens mRNA for protein phosphatase nuclear targeting subunit (CAT53 gene)

```
   1 ctggggttcg tttagaggtt tgaattttct cggagaaaga caggccggcc acgaggaaaa
  61 cagaaacaag ccgcagcaac atctaagccc ttgaaaggat cctgagagag gggggaaagg
 121 gaaaacagca gccaccagcc caaccacttg tgtcttctgc cccttcccac ctatcttgcc
 181 caccccacca gcccacgctg cttgggactt gaaatctgtg gccgaaggac cgtcactaca
 241 taacttcaaa aataatcaac caccctccct tcccaaacca cccaaattca ctcatccagc
 301 gtttactttt ttgaatccac tcagaacttt tttctgcgac ccccctccct aaatggagtt
 361 gggtgggggg gaaatgaata ctgagttggc ctttattttt taaaagactt tttgatccaa
 421 tgaggccccc taaataattg agttttgggt cctggttggt tgttttattt tttttcctcc
 481 aaaattttac cccctccccc ctgagcccga ggtgctgacg tcgcaaaaaa attggataaa
 541 accaccatca tgggttcggg tcccatagac cccaaagaac ttctcaaggg cctggacagc
 601 ttccttaacc gagatgggga agtcaaaagt gtggatggga tttccaagat cttcagtttg
 661 atgaaggaag cacgaaagat ggtgagtcga tgcacttact tgaacattct cctgcagacc
 721 cgttcaccag aaatattggt caaatttatt gacgttggcg gctacaaact tcttaacaat
 781 tggctgacgt attcaaagac aaccaacaac attcccctcc tccagcaaat tctactgacc
 841 ctgcagcatc taccgctcac tgtagaccat ctcaagcaga acaacacagc taaactggtg
 901 aagcagctga gcaagtcaag tgaggatgaa gagctccgga aattggcctc agtccttgtc
 961 agcgactgga tggctgtcat ccgctctcag agcagtaccc agcctgctga gaaagataag
1021 aagaaacgta aagatgaagg aaaaagtcga actacccttc ctgagcgacc tttgacagag
1081 gtgaaggctg agacccgggc tgaggaggcc ccagagaaga agagggagaa gcccaagtct
1141 cttcgcacca cagcacccag tcatgccaag ttccgttcca ctggactaga gctggagaca
1201 ccatccttgg tgcctgtgaa gaagaatgcc agcacagtgg tggtttctga caagtacaac
1261 cttaaaccca tccccctcaa acgtcagagc aacgtagctg ctccaggaga tgccactccc
1321 cctgcagaga agaaatacaa gccactcaac acaacaccta atgccaccaa agagatcaaa
1381 gtgaagatca tcccgccaca gcctatggag ggcctgggct ttctggatgc tcttaattca
1441 gcccctgttc caggcatcaa aattaagaag aaaaaaaaag tactgtcacc tacggctgcc
1501 aagccaagcc cctttgaagg gaaaacgagc acagaaccaa gcacagccaa accttcttcc
1561 ccagaaccag caccaccttc tgaggcaatg gacgcagacc gtccaggcac cccggttccc
1621 cctgttgaag tcccggagct catggataca gcctctttgg agccaggagc tctggatgcc
1681 aagccagtgg agagtcctgg agatcctaac caactgaccc ggaaaggcag gaagaggaaa
1741 agtgtgacat ggcctgagga aggcaaactg agagaatatt tctattttga attggatgaa
1801 actgaacgag taaatgtgaa taagatcaag gactttggtg aggcggctaa gcgagagata
1861 ctgtcagacc gacatgcatt tgagacagcg cggcgtctga gccatgataa catggaggag
1921 aaggtgccct gggtgtgccc ccggcccctg gttctgccct cacctcttgt cacccctgga
1981 agcaatagtc aggagcgata tatccaggct gagcgggaga agggaatcct tcaggagctc
2041 ttcctgaaca aggagagtcc tcatgagcct gatcctgagc cctacgagcc catacccccct
2101 aaactcatcc ccctagatga ggagtgttcc atggatgaga ctccgtatgt tgagactctg
2161 gaacctgggg ggtcaggtgg ctcacctgat ggggcaggag gctccaagtt gcctccagtt
2221 ctggccaatc ttatgggaag catgggtgct ggaaagggcc cccaaggccc tggaggagga
2281 ggcattaatg tccaagagat cctcacctcc atcatgggta gcccaaacag tcatccttca
2341 gaggaactac tgaaacaacc agactattcg gacaagatca agcagatgct ggtgccacat
```

```
2401 ggactcctag gccctggccc aatagccaat ggtttcccac cagggggtcc tgggggcccc
2461 aagggcatgc agcactttcc ccctggacct gggggaccta tgccaggtcc ccatggaggc
2521 cctggtgggc cagtgggtcc acgtcttctg ggtcctccac cccctccccg gggaggtgat
2581 cccttctggg atggcccggg cgaccctatg cggggtggcc caatgcgggg gggtccagga
2641 ccaggtcctg gaccatacca tagaggccga ggtggccgag gaggaaacga acctcctcct
2701 cctcctcctc cattccgagg cgccagagga ggtcgctctg gaggaggacc cccaaatgga
2761 cgagggggcc ctggtggggg catggttgga ggtggtgggc atcgtcctca cgaaggccct
2821 ggtgggggca tgggcaacag cagtggacat cgtccccacg aaggccctgg cggtggcatg
2881 ggaagtgggc atcgcccccca tgaaggccct ggtggtagca tgggtggggg tggaggacat
2941 cgtccccacg aaggccctgg cggtggcatc agtggtggca gtggccatcg tccccatgaa
3001 ggccctggcg gaggaatggg tgccggtggt ggacatcgcc cccacgaagg ccctggcgga
3061 agcatgggtg gaagtggtgg acatcgtccc catgaaggcc ctggacacgg ggggccccat
3121 ggccaccggc ctcatgatgt ccctggtcac cgaggccatg accatcgagg gccgccacct
3181 catgagcacc gtggccatga tggtcctggc cacgggggag ggggccaccg agggcacgat
3241 ggaggccaca gccatggagg agacatgtca aaccgccctg tctgccgaca tttcatgatg
3301 aagggcaact gccgctatga gaacaactgt gccttctacc acccgggtgt caatgggccc
3361 cccctgccct aggaccatt tgcctgccct gttcacacaa ccccctgtgga ctgcagcctc
3421 gctctttcca ccctgttatg gcttctgtga ggcccatttt cccttttccc cagctgatga
3481 ggagccggcc ccctcagttc ccacttgctt gggttcctgg gggttttctg atcactggtg
3541 cgcattgatg tacatatttt cctccagtct ggggaggaga gagactggaa acgttcctgg
3601 actgctgaag aggagaccca gttggcttca ctttttgaga agattcgccc tgtaccccaa
3661 accccctttcc agtattaccc ttaatgcttg agaacctaaa gctggttatc ctggcgaaca
3721 cccctaccct tctattgcgg gtccccacat gcacacagaa ctctgacaca ggatcagctg
3781 cacttaagaa atcatcccag ctaagttcat tattcctcat ggggtgggga gatgctgaaa
3841 ggggtattgt atatcccact gcactgagag ggctcaatca gctggatttg agttctggaa
3901 cacacatcat ccccacccct cccccagcgt gggctcacca ttcttagtcc tttctcaagt
3961 gggaccttca actttctgtg aacacccagt ctgcgtcctg ggtctgctag gttcgatgat
4021 ggcgaactcg tatctgcatc cggtgcaagt tttagctggc agaggtgaga ccggtggtgc
4081 tggtctgcct ttgccaacta tagccagtct ggagacttga taaaatactt cagtgagacc
4141 agcttctcat caacttgggc ccggcgtgct gggcctgaaa gtcacactac atgcactgcc
4201 tttgggagtc agctcactcc ctgctcccac ctggaacctt gccagcgtga aggaggcttc
4261 caggtacttc accctgtcaa ccacctctga atccccacca ggcgccttcc tgggtggatt
4321 caacaagatg atttgccct ttcccagttc tctccttcac tttggcatca gttgttttct
4381 atgaaaacag tggattggtt gggttttgtg cagggtcttg ggttagagcc aaaatggatt
4441 tgaggatgag tattttttt tttggttttg tatattttgt acattaataa taaacagtgg
4501 aaagagaagc agcttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa
```

>gi|78190459|ref|NM_000978.3| Homo sapiens ribosomal protein L23 (RPL23), mRNA

```
  1 ggccacgtga ggagggtggg cggggcgtta aagttcatat cccagtgtcc tttgaatcga
 61 cttccttttt tcttttttcc ggcgttcaag atgtcgaagc gaggacgtgg tgggtcctct
121 ggtgcgaaat tccggatttc cttgggtctt ccggtaggag ctgtaatcaa ttgtgctgac
181 aacacaggag ccaaaaacct gtatatcatc tccgtgaagg ggatcaaggg acggctgaac
241 agacttcccg ctgctggtgt gggtgacatg gtgatggcca cagtcaagaa aggcaaacca
301 gagctcagaa aaaaggtaca tccagcagtg gtcattcgac aacgaaagtc ataccgtaga
361 aaagatggcg tgtttcttta ttttgaagat aatgcaggag tcatagtgaa caataaaggc
421 gagatgaaag gttctgccat tacaggacca gtagcaaagg agtgtgcaga cttgtggccc
481 cggattgcat ccaatgctgg cagcattgca tgattctcca gtatatttgt aaaaaataaa
541 aaaaaaaact aaacccatta aaagtattt gtttgcaaaa aaaaaaaaaa aaaa
```

Bei diesem Klon war das sequenzierte Transkript so kurz, dass auch das 3’-Ende des cDNA-Klons ermittelt werden konnte.

>gi|48255928|ref|NM_016488.5| Homo sapiens periphilin 1 (PPHLN1), transcript variant 1, mRNA

```
   1 attgcgcgcg ccggaagtac ctacctggga taacggcggc gagcggacgg ctgcatttac
  61 ggggtctccc ggagggccag agtcgtggct tacagaagag acgaaatgtg gtctgaggga
 121 cgatatgaat atgaaagaat tccgagagaa cgagcacctc ctcgaagtca tcccagtgat
 181 ggctacaata gactagttaa tattgtgcca aagaaaccac cactgctaga cagacctggt
 241 gaaggaagct acaatagata ttacagtcat gttgattacc gagactatga cgagggccgc
 301 agtttttctc atgatcgaag aagtggtcca cctcacagag gagatgaatc tggttataga
 361 tggacaagag acgatcattc tgcaagcagg caacctgaat acagggacat gagagatggc
 421 tttagaagaa aaagtttcta ctcttcccat tatgcgagag agcggtctcc ttataaaagg
 481 gacaatactt ttttcagaga atcacctgtt ggccgaaagg attctccaca cagcagatct
 541 ggttccagtg tcagtagcag aagctactct ccagaaagga gcaaatcata ctctttccat
 601 cagtctcaac atagaaagtc cgtgcgtcct ggtgcctcct acaaacggca gaatgaagga
 661 aatcctgaaa gagataaaga gaggcctgtc cagtctttga aaacatcaag agatacttca
 721 ccctcaagtg gttcagcagt ttcttcatca aaggtgttag acaaacccag taggctaact
 781 gaaaaggaac ttgctgaggc tgcaagcaag tgggctgctg aaaagctaga gaaatcagat
 841 gaaagtaact tgcctgaaat ttctgagtat gaggcgggat ccacagcacc attgtttact
 901 gaccagccag aggaacctga gtcaaacaca acacatggga tagaattatt tgaagatagt
 961 cagctaacca ctcgctctaa agcaatagca tcaaaaacca aagagattga acaggtttac
1021 cgacaagact gtgaaacttt cgggatggtg gtgaaaatgc tgattgaaaa agatccttca
1081 ttagaaaagt ctatacagtt tgcattgagg cagaatttac atgaaataga gtctgcagga
1141 cagacttggc agcaggtacc ccctgtgagg aacactgaaa tggatcacga cggaaccccc
1201 gaaaacgaag gcgaagagac tgcgcagtca gccccgcagc cccgcaggc cccgcagccc
1261 ctgcagcccc ggaagaaacg ggttcgtcgg acgacacagc ttcgtcggac gacaggagcc
1321 ccagacatta cctgggggat gctgaagaag acaactcagg aggctgagag gatcctgctc
1381 cgaacacaga caccattcac tccagaaaat ttgttccttg ctatgctctc tgttgtacat
1441 tgcaactcac gcaaggatgt aaagccagaa aacaagcagt aactgctatg cctgacaaaa
1501 ctgttgctgc acacatctgt actcgtcaat caacaaaacc tgatgcaaaa aacagaaaag
1561 gggtgatgta ggagatggtc aggttggtag gagaagctat aaggaaagac gcaattggaa
1621 ggtcgggagg ttttccaaag cttcaggaga gaataaagct gaaggcagct ttattaatta
1681 attctcttac cctgaggctg agggcgaaca gtaggtagca agggagtgta aaggaattta
1741 tctagataag tttgtttact tatgccctcc ggaaatcatg caagactgct ccctgcaaag
1801 gggggcgaca atgttcatta ctcacaaatt gtgttggctt caggcctttg gtattctgtc
1861 tctactgaat aaatacaaat ggttccagcc tatcaggact gcactctctt ctcggctgca
1921 ctaaagctgg cactccccca gccgttctca tgcaaaatac ctgtgtcaga atactccttt
1981 catccatcac tcagccagag tcttcaggac agactccgca tgggacttgt ccaaaaaaac
2041 tctaatcaaa agaggaaaat tttggaatat gccaggaata gtggaatttt atttttttaaa
2101 tttttttata ggcccatatg ctctatctca agaaacaaga tgattgtaac atgtccatga
2161 ttaaactatt ggcagattat tgctgtgtta atctctgtag tctaatgagt tctttgttct
2221 gttctgctgc cttttacgtt ttcttgtcct ttcaaaagtg ttcttgaaag aaacaaagcg
2281 aataggcagt tagcacagca cagctacccc ttaccaagca gtctatggaa acaacccctc
2341 atccaaatca tgggttagtt aagaatctaa ctggggcaat taagatgaat tccactcact
2401 tcctggtcac ttcagcagcc cagcggcatt gagccaaaat atacaattct gtgttattag
2461 tgaggaaact ttaaaactca tgtttgttat tacttactac ccaatttcat tatcctccct
2521 tcctctttcc atttctattc tctctcactt gaattctggc attattttta gtggcctcta
2581 ctgataatac ctaccctaga gtacataaaa attatattaa aagaggaagt agcagtatgc
2641 ataattttaa cagattctat aatgggtgcc tcaaaatatg tattgtgcca ttccgcaaat
2701 ttaaaagcta attgaggaca attttttttt aatttcctaa atgagaccac cttggatttt
2761 tatttttgcc atttagatgt ttatacttat ttagctttta taaaacataa gccaagctaa
2821 atcccacata acaactctgg tattcttccc tcatatgagc agtgatttta tttgttaccc
2881 accttagata gactaagaaa gttctagtct tgtttctcct tctccccgct tccctggggt
2941 ttttccttac cataagtatt ctggtccgag ggttcagttc ctttagtcaa gatgtcacaa
3001 gtttaaaaac aaaacttgag aaactaccaa aggctcagga gttgtccact ttgttgaaat
3061 ccattaaatt agagaagtct cactaacaga tgtatttaaa tataggtaca acaaataatt
3121 tctttttctc cccttcccca aattacagtc agcatttaaa gctgtttatg gcttgccatc
3181 agcattattc tggtaggctt gttagtgtta aaatctattt gatttttttt tttttttttg
3241 cctcttaaag tctaatttta ggatggatga attcagatgt ttaccagagt gtgtatttta
3301 cataatgttc ttgattaaaa agacttgttt gtaaattatc cgttgttttt gcatatgccc
3361 agttgatgtg ataaaatttt cattgtcttg ccatataaag ccttggttat caacaggtgg
3421 aatgtagata ttgtaaagct ttttgtgaat taaaagtgca aaataaagca accacattta
3481 agt
```

>gi|210147480|ref|NM_023009.5| Homo sapiens MARCKS-like 1 (MARCKSL1), mRNA

```
   1 ggcattctgg cgcggagcgg agcggcggcg ggcgcagcta gcgggtcggc cgcggagcgg
  61 aggtgcagct cggcttcccc cggcacccct ccccctcggg cgccagcccc acccctccgc
 121 cggccgggcc gaccccgccg tactatcccc tgcggcgcga gcccggggcg gctccaagcg
 181 ccccccagca gacccccatc atgggcagcc agagctccaa ggctccccgg ggcgacgtga
 241 ccgccgagga ggcagcaggc gcttccccccg cgaaggccaa cggccaggag aatggccacg
 301 tgaaaagcaa tggagactta tcccccaagg gtgaagggga gtcgcccccct gtgaacggaa
 361 cagatgaggc agccggggcc actggcgatg ccatcgagcc agcaccccct agccagggtg
 421 ctgaggccaa gggggaggtc ccccccaagg agacccccaa gaagaagaag aaattctctt
 481 tcaagaagcc tttcaaattg agcggcctgt ccttcaagag aaatcggaag gagggtgggg
 541 gtgattcttc tgcctcctca cccacagagg aagagcagga gcagggggag atcggtgcct
 601 gcagcgacga gggcactgct caggaaggga aggccgcagc caccccctgag agccaggaac
 661 cccaggccaa gggggcagag gctagtgcag cctcagaaga agaggcaggg ccccaggcta
 721 cagagccatc cactccctcg gggccggaga gtggccctac accagccagc gctgagcaga
 781 atgagtagct aggtaggggc aggtgggtga tctctaagct gcaaaaactg tgctgtcctt
 841 gtgaggtcac tgcctggacc tggtgccctg gctgccttcc tgtgcccaga aaggaagggg
 901 ctattgcctc ctcccagcca cgttcccttt cctcctctcc ctcctgtgga ttctcccatc
 961 agccatctgg ttctcctctt aaggccagtt gaagatggtc ccttacagct tcccaagtta
1021 ggttagtgat gtgaaatgct cctgtccctg gccctacctc cttccctgtc cccacccctg
1081 cataaggcag ttgttggttt tcttccccaa ttcttttcca agtaggtttt gtttacccta
1141 ctccccaaat ccctgagcca gaagtggggt gcttatactc ccaaaccttg agtgtccagc
1201 cttcccctgt tgtttttagt ctcttgtgct gtgcctagtg gcacctgggc tggggaggac
1261 actgccccgt ctaggttttt ataaatgtct tactcaagtt caaacctcca gcctgtgaat
1321 caactgtgtc tctttttga cttggtaagc aagtattagg ctttggggtg gggggaggtc
1381 tgtaatgtga aacaacttct tgtctttttt tctcccactg ttgtaaataa cttttaatgg
1441 ccaaacccca gatttgtact tttttttttt ttctaactgc taaaaccatt ctcttccacc
1501 tggttttact gtaacatttg gaaaaggaat aaatgtcgtc cctttaaaaa aaaaaaaaaa
1561 aaaaaaagaa aaaaaaaaaa aaaa
```

>gi|27886591|ref|NM_153831.2| Homo sapiens PTK2 protein tyrosine kinase 2 (PTK2), transcript variant 1, mRNA

```
   1 gaccactgtg agcccgcggc gtgaggcgtg ggaggaagcg cggctgctgt cgcccagcgc
  61 cgccccgtcg tcgtctgcct tcgcttcacg gcgccgagcc gcggtccgag cagaactggg
 121 gctcccttgc atcttccagt tacaaattca gtgccttctg cagtttcccc agagctcctc
 181 aagaataacg gaagggagaa tatgacagat acctagcatc tagcaaaata atggcagctg
 241 cttaccttga ccccaacttg aatcacacac caaattcgag tactaagact cacctgggta
 301 ctggtatgga acgttctcct ggtgcaatgg agcgagtatt aaaggtcttt cattattttg
 361 aaagcaatag tgagccaacc acctgggcca gtattatcag gcatggagat gctactgatg
 421 tcaggggcat cattcagaag atagtggaca gtcacaaagt aaagcatgtg gcctgctatg
 481 gattccgcct cagtcacctg cggtcagagg aggttcactg gcttcacgtg gatatgggcg
 541 tctccagtgt gagggagaag tatgagcttg ctcacccacc agaggagtgg aaatatgaat
 601 tgagaattcg ttatttgcca aaaggatttc taaaccagtt tactgaagat aagccaactt
 661 tgaatttctt ctatcaacag gtgaagagcg attatatgtt agagatagct gatcaagtgg
 721 accaggaaat tgctttgaag ttgggttgtc tagaaatacg gcgatcatac tgggagatgc
 781 ggggcaatgc actagaaaag aagtctaact atgaagtatt agaaaaagat gttggtttaa
 841 agcgattttt tcctaagagt ttactggatt ctgtcaaggc caaaacacta agaaaactga
 901 tccaacaaac atttagacaa tttgccaacc ttaatagaga agaaagtatt ctgaaattct
 961 ttgagatcct gtctccagtc tacagatttg ataaggaatg cttcaagtgt gctcttggtt
1021 caagctggat tatttcagtg gaactggcaa tcggcccaga agaaggaatc agttacctaa
1081 cggacaaggg ctgcaatccc acacatcttg ctgacttcac tcaagtgcaa accattcagt
1141 attcaaacag tgaagacaag gacagaaaag gaatgctaca actaaaaata gcaggtgcac
1201 ccgagcctct gacagtgacg gcaccatccc taaccattgc ggagaatatg gctgacctaa
1261 tagatgggta ctgccggctg gtgaatggaa cctcgcagtc atttatcatc agacctcaga
1321 aagaaggtga acgggctttg ccatcaatac caaagttggc caacagcgaa aagcaaggca
1381 tgcggacaca cgccgtctct gtgtcagaaa cagatgatta tgctgagatt atagatgaag
1441 aagatactta caccatgccc tcaaccaggg attatgagat tcaaagagaa agaatagaac
1501 ttggacgatg tattggagaa ggccaatttg gagatgtaca tcaaggcatt tatatgagtc
1561 cagagaatcc agctttggcg gttgcaatta aaacatgtaa aaactgtact tcggacagcg
1621 tgagagagaa atttcttcaa gaagccttaa caatgcgtca gtttgaccat cctcatattg
```

```
1681 tgaagctgat tggagtcatc acagagaatc ctgtctggat aatcatggag ctgtgcacac
1741 ttggagagct gaggtcattt ttgcaagtaa ggaaatacag tttggatcta gcatctttga
1801 tcctgtatgc ctatcagctt agtacagctc ttgcatatct agagagcaaa agatttgtac
1861 acagggacat tgctgctcgg aatgttctgg tgtcctcaaa tgattgtgta aaattaggag
1921 actttggatt atcccgatat atggaagata gtacttacta caaagcttcc aaaggaaaat
1981 tgcctattaa atggatggct ccagagtcaa tcaattttcg acgttttacc tcagctagtg
2041 acgtatggat gtttggtgtg tgtatgtggg agatactgat gcatggtgtg aagccttttc
2101 aaggagtgaa gaacaatgat gtaatcggtc gaattgaaaa tggggaaaga ttaccaatgc
2161 ctccaaattg tcctcctacc ctctacagcc ttatgacgaa atgctgggcc tatgacccca
2221 gcaggcggcc caggtttact gaacttaaag ctcagctcag cacaatcctg gaggaagaga
2281 aggctcagca agaagagcgc atgaggatgg agtccagaag acaggccaca gtgtcctggg
2341 actccggagg gtctgatgaa gcaccgccca agcccagcag accgggttat cccagtccga
2401 ggtccagcga aggattttat cccagcccac agcacatggt acaaaccaat cattaccagg
2461 tttctggcta ccctggttca catggaatca cagccatggc tggcagcatc tatccaggtc
2521 aggcatctct tttggaccaa acagattcat ggaatcatag acctcaggag atagcaatgt
2581 ggcagcccaa tgtggaggac tctacagtat tggacctgcg agggattggg caagtgttgc
2641 caacccatct gatggaagag cgtctaatcc gacagcaaca ggaaatggaa gaagatcagc
2701 gctggctgga aaaagaggaa agatttctga aacctgatgt gagactctct cgaggcagta
2761 ttgacaggga ggatggaagt cttcagggtc cgattggaaa ccaacatata tatcagcctg
2821 tgggtaaacc agatcctgca gctccaccaa agaaaccgcc tcgccctgga gctcccggtc
2881 atctgggaag ccttgccagc ctcagcagcc ctgctgacag ctacaacgag ggtgtcaagc
2941 ttcagcccca ggaaatcagc ccccctccta ctgccaacct ggaccggtcg aatgataagg
3001 tgtacgagaa tgtgacgggc ctggtgaaag ctgtcatcga gatgtccagt aaaatccagc
3061 cagccccacc agaggagtat gtccctatgg tgaaggaagt cggcttggcc ctgaggacat
3121 tattggccac tgtggatgag accattcccc tcctaccagc cagcacccac cgagagattg
3181 agatggcaca gaagctattg aactctgacc tgggtgagct catcaacaag atgaaactgg
3241 cccagcagta tgtcatgacc agcctccagc aagagtacaa aaagcaaatg ctgactgctg
3301 ctcacgccct ggctgtggat gccaaaaact tactcgatgt cattgaccaa gcaagactga
3361 aaatgcttgg gcagacgaga ccacactgag cctcccctag gagcacgtct tgctaccctc
3421 ttttgaagat gttctctagc cttccaccag cagcgaggaa ttaaccctgt gtcctcagtc
3481 gccagcactt acagctccaa ctttttgaa tgaccatctg gttgaaaaat ctttctcata
3541 taagtttaac cacactttga tttgggttca tttttgttt tgttttttc aatcatgata
3601 ttcagaaaaa tccaggatcc aaaatgtggc gtttttctaa gaatgaaaat tatatgtaag
3661 cttttaagca tcatgaagaa caatttatgt tcacattaag atacgttcta aagggggatg
3721 gccaaggggt gacatcttaa ttcctaaact accttagctg catagtggaa gaggagagca
3781 tgaagcaaag aattccagga aacccaagag gctgagaatt cttttgtcta ccatagaatt
3841 attatccaga ctggaatttt tgtttgttag aacacccttc agttgcaata tgctaatccc
3901 actttacaaa gaatataaaa gctatatttt gaagacttga gttatttcag aaaaaactac
3961 agccctttt gtcttacctg ccttttactt tcgtgtggat atgtgaagca ttgggtcggg
4021 aactagctgt agaacacaac taaaaactca tgtcttttt cacagaataa tgtgccagtt
4081 ttttgtagca atgttatttc tcttggaagc agaaatgctt tgtaccagag cacctccaaa
4141 ctgcattgag gagaagttcc agaaccatcc ccttttcca tttttatata atttataaag
4201 aaagattaaa gccatgttga ctattttaca gccactggag ttaactaacc cttccttgta
4261 tctgtcttcc caggagagaa tgaagcaaaa caggaatttg gtttctttt gatgtccagt
4321 tacaccatcc attctgttaa ttttgaaaaa atataccctc cctttagttt gttgggggat
4381 ataaattatt ctcaggaaga atataatgaa ctgtacagtt actttgacct attaaaaagg
4441 tgttaccagt aaa
```

>gi|10434669|dbj|AK022970.1| Homo sapiens cDNA FLJ12908 fis, clone NT2RP2004399 (DPH3, KTI11 homolog (S. cerevisiae) [Homo sapiens])

```
  1 gatgccgagc ccaggccggt tccggcgaag ttaaaccctc ggagctggcc tcggactgct
 61 ggggcgttac cccttcggcc acccccgctg accatggcag tgtttcatga cgaggtggaa
121 atcgaggact tccaatatga cgaggactcg gagacgtatt tctatccctg cccatgtgga
181 gataacttct ccatcaccaa ggatcagttt gtgtgtggag aaacagtccc agcccccttca
241 gccaacaaag aattagttaa atgctgaaga agccttcagg aatccaaatc ctgaacattt
301 ggaatgagcc cagatagaaa tatcgaatgc aaagctactg gcttcacaga gacaaccatt
361 tatgatttgc tgttctgtaa gagtgtggat tctttctatc aactgctgat atcatcttca
421 ggaagcaagt ccataacatg acatatctgg attttgtgct tagaacctta aattggaagc
481 attcttaatt atgcatctaa atttaaaaga agataatttc aaaacagtgc tttctttccc
541 ttggtttcat cattttcata tcttaaacca aattacttcg gtatctgaca acagcatcat
```

```
 601 ctacctcagt cattaggatt tcttaataaa aaagagattg tatttttgac ttggttatta
 661 agattattaa aattagccct tcctttgaaa tatgacatca gctttgctgt tctaaattta
 721 aaattagttg cttcatcagt accacacttc cagtttctat accaagccag tctcctcagt
 781 tttcccatta gaatggacat gttctgttca gcgtgtcatt tctgtaatgc ttcatgcaga
 841 gagtttggtc atagtattaa agagaaaata cagtgaggtc acaatgtctc cagagctaaa
 901 agttagtgaa caagaaagaa agtccaaaat gaagtgatga aagaatgagg acttttctta
 961 tattctgcat atttcttgga agtcaggaca agatgaaaag aaaaacatcc aaaagaagtg
1021 aaattggtga cagaatgaga ggagcaaagc ataccagtgt agtaagtgga atgtttgaat
1081 gactttgcca ggtcagagca agtaatattt ctgtatctga gtttttgttt gtgttttgat
1141 aaggctaatg aaattgcatt ccaggtaggg gttaacgtca aatttccatg gctggtagct
1201 gtgcttttgg catatcacag tgttgtgtca ctactacaag gtaaagcatc tacagcggag
1261 aatgagcttg aaaatgagag acctattgtg aataaatatg cccatgagag catatttaat
1321 aagcctctat aacatgcagc caaaccagac attcactcct gcagagaaat gttgccctgg
1381 agaaaaagag atatataaag ataggctatc acccttcttt tgctgcagta ctaagcatag
1441 caagaaatta gaatcattta cattggaaat ttgaaaattc cctttatata cacaacttta
1501 ctgtgtataa ataaaaaata tttattaatg cagtgatgtc cgtcaggttg ttttaggaat
1561 ggcttctgca attagaaaaa tagcttgcta gaatgtaaat gttctgttac tggtaaatgt
1621 actgcacaca ttcattggac gttaaaacaa gtgagtagcc tttttacct gccagcagca
1681 tggctgtgtg cagccactag gctgagacaa taaattacca aaaattataa tgtaccgagc
1741 tgaaaatgct cagtacatta tgtggcatat tctggatgtg atgagaaatc tcattgccat
1801 ttgggacact gacatcccag aagtaatcca caactgcttt gcaaaagcaa agtgactgct
1861 cagatgaaca gagcagagta ctcactcact atggtggcat cagctgcaaa gcaaaattaa
1921 ctgtcccatg atcatgttga tggttttcta gatactgcca acatgttagc tctttctgat
1981 gctgatgagt ttcaaacacg aacagacacc cttgatgtgg gtttgctaag aacatagaag
2041 aacaggaaga aaagttgcca ggttcacaca tcccaggaaa aaagaagcat aaaaagcatt
2101 agcagtcagt gactgatgat aatgctgcaa taatgggaat ggttttgttt ctaaaccaaa
2161 ttatttctaa atcaaatcat ttattgcttt gtttctaaag cagttgagtc actaagtttg
2221 tgaactgtag gagaacacat caagattgaa tcctgtgtta agcagaaggt aaaaccagag
2281 ccaggcgcag tggctcgtgc ctgtaatccc agctactcag gaagctaagg caggaggatc
2341 atgtgaggcc aggagttcaa gactagcctg ggcaacatag aaagaccctg tctctaaaaa
2401 atcttctttt aattagcaag gtgtggggcc ttgagcaaat tgcttgggcc caggagtttg
2461 aggctgtggt gagctgtgat cacaccactg cgttccagcc tgtgtgacag ggcaagacct
2521 catgcctaaa aaataaagag aaagcagagt aaaactggac tctgagatac gactaaagtt
2581 ctgtgtgata cgtgtgcctt atttagctca agacattcct ggagcaccta taaaaactga
2641 cttgtaatcc aggctatgtc tctttagctt cgtaatcttt ggcaaggcca ttggattctt
2701 cagctgtaca attaggagac tcgatcaggt gattgccttt ctcagctgtc agttctctaa
2761 tttcaggctt ggtagcttgt aggaactgaa attgcaatta aaacctttat aaactcaaac
2821 taaatcatga attacagaaa aagtccattc ttccaaaact tgatgttacc acacttacaa
2881 gtttaaaata tgaagtcgac tgtttaaagg attctgcata tattctagtg tgcacattca
2941 gaaacatttt tcttggaaaa agtacccaac actttttata actgcacata ttaatttatt
3001 gccagaataa attgcattgc atgctaaata aagtcagata attcaaatcc
```

5.5 Negativkontrollen für die RNA *in situ* Hybridisierung (3.1, 3.4)

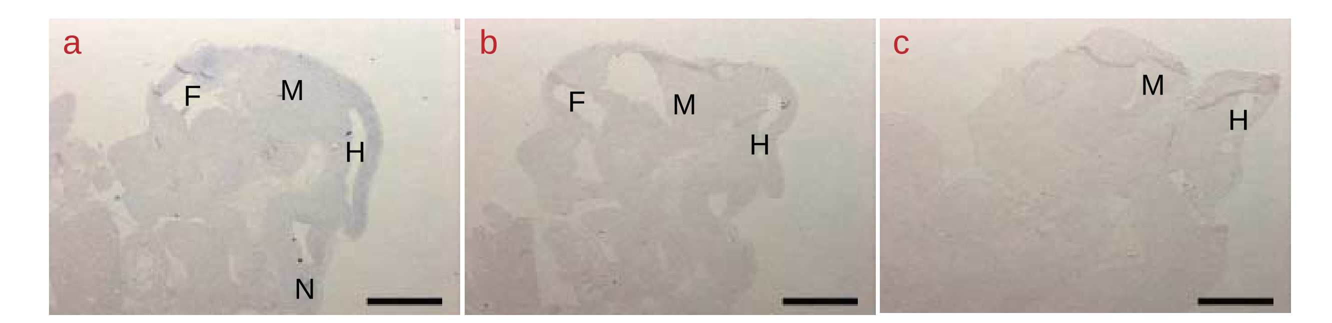


Abbildung 54: RNA *in situ* Hybridisierung mit sense Sonden für *Megap* (a), *Robo1* (b) und *Lpd* (c) (Embryonalstadium E11.5 p.c.). Sowohl für *Megap* als auch für *Robo1* und *Lpd* wurde keine unspezifische Färbung detektiert. H – Hinterhirn; M – Mittelhirn; F – Vorderhirn; N – Neuralrohr; Die Maßstabsbalken in (a) bis (c) entsprechen 1000 µm.

5.6 Massenspektrometrie-Daten (GST-Pulldown mit adultem Mausgehirn; 3.2.2.1)

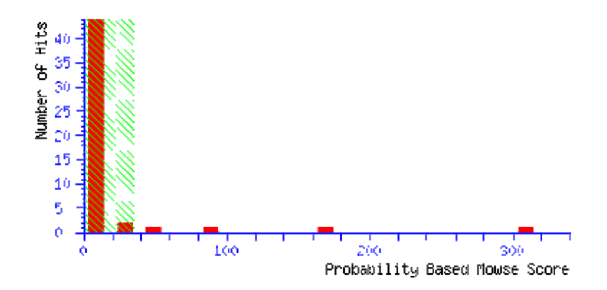
1* - YLP motif containing 1 (ZAP3)

Mascot Search Results

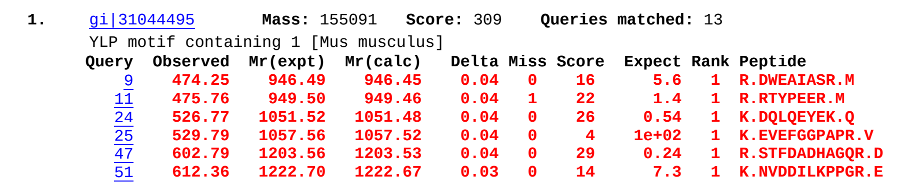
```
User            : Uwe Warnken
Email           : U.Warnken@dkfz.de
Search title    :
MS data file    : C:\Program Files\Matrix Science\Mascot Daemon\data\060803_VE1122_1.pkl
Database        : NCBInr 080606 (3841279 sequences; 1323634604 residues)
Taxonomy        : Mus musculus (house mouse) (100484 sequences)
Timestamp       : 7 Aug 2006 at 14:10:32 GMT
Significant hits: gi|31044495  YLP motif containing 1 [Mus musculus]
                  gi|16797665  GAP3 [Mus musculus]
                  gi|74189848  unnamed protein product [Mus musculus]
```

Probability Based Mowse Score

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.
Individual ions scores > 35 indicate identity or extensive homology (p<0.05).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Archive Report of Selected Matches



1. gi|31044495 **Mass:** 155091 **Score:** 309 **Queries matched:** 13
YLP motif containing 1 [Mus musculus]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
9	474.25	946.49	946.45	0.04	0	16	5.6	1	R.DWEAIASR.M
11	475.76	949.50	949.46	0.04	1	22	1.4	1	R.RTYPEER.M
24	526.77	1051.52	1051.48	0.04	0	26	0.54	1	K.DQLQEYEK.Q
25	529.79	1057.56	1057.52	0.04	0	4	1e+02	1	K.EVEFGGPAPR.V
47	602.79	1203.56	1203.53	0.04	0	29	0.24	1	R.STFDADHAGQR.D
51	612.36	1222.70	1222.67	0.03	0	14	7.3	1	K.NVDDILKPPGR.E

```
    52    614.32   1226.63   1226.59    0.04   0     31      0.14    1  K.ITDESGHLAER.A
    53    618.81   1235.61   1235.57    0.04   0     30      0.18    1  R.HFDQFWSAAK.T
    54    621.31   1240.61   1240.57    0.04   0      6        46    1  K.MAEHWEVAPR.H + Oxidation (M)
    55    651.35   1300.68   1300.64    0.04   1     60   0.00018    1  R.DKEVEFGGPAPR.V
    57    663.85   1325.69   1325.65    0.04   0     24      0.74    1  R.VGFQYQGIMQR.H
    65    725.39   1448.77   1448.73    0.04   0     41     0.014    1  R.AIGFVVGQTDWEK.I
    76    597.68   1790.01   1789.97    0.04   0      9        19    1  R.MPLPAPALGHQPPPVPR.V + Oxidation (M)
```

```
3.     gi|16797665        Mass: 16663     Score: 83      Queries matched: 2
       GAP3 [Mus musculus]
      Query   Observed   Mr(expt)   Mr(calc)    Delta Miss Score Expect Rank Peptide
        43    568.27   1134.52   1134.47    0.05   0     49  0.0024    1  R.ASEDWWEGR.H
        63    702.85   1403.68   1403.64    0.04   0     34    0.06    1  K.ADSEASSGPLLDDK.A


       Proteins matching the same set of peptides:
       gi|21311769        Mass: 125311    Score: 82      Queries matched: 2
       WARP [Mus musculus]
       gi|27597098        Mass: 111502    Score: 82      Queries matched: 2
       brain stress early protein Gbi isoform 1 [Mus musculus]
```

```
4.     gi|74189848        Mass: 98017     Score: 50      Queries matched: 2
       unnamed protein product [Mus musculus]
      Query   Observed   Mr(expt)   Mr(calc)    Delta Miss Score Expect Rank Peptide
        16    493.81    985.60    985.56    0.04   0     16      5.8    1  R.IDGITIQAR.Q
        36    554.82   1107.62   1107.58    0.04   0     34    0.068    1  K.ITALDEFATK.L


       Proteins matching the same set of peptides:
       gi|74205468        Mass: 114278    Score: 50      Queries matched: 2
       unnamed protein product [Mus musculus]
       gi|94366348        Mass: 286709    Score: 50      Queries matched: 2
       PREDICTED: spectrin alpha 2 isoform 20 [Mus musculus]
       gi|94366350        Mass: 286025    Score: 50      Queries matched: 2
       PREDICTED: spectrin alpha 2 isoform 21 [Mus musculus]
       gi|94366352        Mass: 283519    Score: 50      Queries matched: 2
       PREDICTED: spectrin alpha 2 isoform 23 [Mus musculus]
       gi|94366354        Mass: 285221    Score: 50      Queries matched: 2
       PREDICTED: spectrin alpha 2 isoform 22 [Mus musculus]
       gi|94366356        Mass: 279415    Score: 50      Queries matched: 2
       PREDICTED: spectrin alpha 2 isoform 19 [Mus musculus]
       gi|94366358        Mass: 278840    Score: 50      Queries matched: 2
       PREDICTED: spectrin alpha 2 isoform 15 [Mus musculus]
       gi|94366360        Mass: 278483    Score: 50      Queries matched: 2
       PREDICTED: spectrin alpha 2 isoform 17 [Mus musculus]
       gi|94366362        Mass: 279076    Score: 50      Queries matched: 2
       PREDICTED: spectrin alpha 2 isoform 14 [Mus musculus]
       gi|94366364        Mass: 275189    Score: 50      Queries matched: 2
       PREDICTED: spectrin alpha 2 isoform 12 [Mus musculus]
       gi|94366366        Mass: 235695    Score: 50      Queries matched: 2
       PREDICTED: spectrin alpha 2 isoform 11 [Mus musculus]
       gi|94366368        Mass: 232108    Score: 50      Queries matched: 2
       PREDICTED: spectrin alpha 2 isoform 3 [Mus musculus]
       gi|94368049        Mass: 286640    Score: 50      Queries matched: 2
       PREDICTED: similar to Spectrin alpha chain, brain (Spectrin, non-erythroid alpha chain) (Alpha-II s
       gi|94368051        Mass: 285151    Score: 50      Queries matched: 2
       PREDICTED: similar to Spectrin alpha chain, brain (Spectrin, non-erythroid alpha chain) (Alpha-II s
```

Search Parameters

```
Type of search         : MS/MS Ion Search
Enzyme                 : Trypsin
Fixed modifications    : Carbamidomethyl (C)
Variable modifications : Oxidation (M)
Mass values            : Monoisotopic
Protein Mass           : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance : ± 200 ppm
Fragment Mass Tolerance: ± 0.1 Da
Max Missed Cleavages   : 1
Instrument type        : ESI-QUAD-TOF
Number of queries      : 83
```

2* - Lamellipodin (Ras association and pleckstrin homology domains 1 isoform 2)

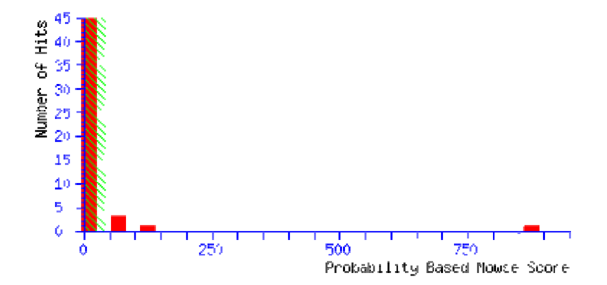
Mascot Search Results

```
User          : Uwe Warnken
Email         : U.Warnken@dkfz.de
Search title  :
MS data file  : C:\Program Files\Matrix Science\Mascot Daemon\data\060803_VE1122_2.pkl
Database      : NCBInr 080606 (3841279 sequences; 1323634604 residues)
Taxonomy      : Mammalia (mammals) (454192 sequences)
```

```
Timestamp       : 7 Aug 2006 at 13:14:29 GMT
Significant hits: gi|82879074  PREDICTED: Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1 isoform 2 [Mus musculus]
                  gi|16797665  GAP3 [Mus musculus]
                  gi|30794348  casein alpha-S1 [Bos taurus]
```

Probability Based Mowse Score

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.
Individual ions scores > 41 indicate identity or extensive homology (p<0.05).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Archive Report of Selected Matches

1. gi|82879074 **Mass:** 137281 **Score:** 873 **Queries matched:** 34
PREDICTED: Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1 isoform 2 [Mus musculus]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
11	489.76	977.50	977.47	0.03	0	22	6	1	R.GTQLEESSK.A
13	499.28	996.55	996.53	0.03	0	9	94	1	R.ASGIYYVPK.G
17	523.80	1045.58	1045.56	0.03	0	39	0.13	1	K.NPQNYLLGK.K
22	536.73	1071.44	1071.41	0.03	0	7	2.2e+02	1	K.YLCCDDAR.T
23	538.29	1074.56	1074.54	0.03	0	35	0.35	1	R.QVLDNLMDK.S
27	544.32	1086.63	1086.60	0.03	0	19	13	1	K.RPSVDSLVSK.F
29	546.29	1090.56	1090.53	0.03	0	(29)	1.1	1	R.QVLDNLMDK.S + Oxidation (M)
41	574.79	1147.57	1147.54	0.03	0	48	0.015	1	K.APTDCCLALK.H
45	587.81	1173.60	1173.57	0.04	0	58	0.0016	1	K.FAPPAESGSPSK.E
51	599.78	1197.54	1197.51	0.03	0	16	19	1	K.SGSCAEHPEPK.R
61	647.83	1293.65	1293.62	0.03	0	33	0.37	1	K.MFGAWLGELDR.L
62	655.83	1309.64	1309.61	0.03	0	(25)	2.3	1	K.MFGAWLGELDR.L + Oxidation (M)
65	680.82	1359.62	1359.59	0.03	0	(37)	0.16	1	R.QETNMANFSYR.F
66	685.86	1369.71	1369.69	0.03	0	31	0.55	1	K.QLYTNYQEALK.R
67	688.81	1375.61	1375.58	0.03	0	40	0.084	1	R.QETNMANFSYR.F + Oxidation (M)
71	472.26	1413.75	1413.74	0.02	0	15	25	1	R.LQNAAQHSGTLFK.S
72	718.91	1435.80	1435.77	0.03	0	70	7.7e-05	1	K.SLPASGTPQSPPAVK.A
73	720.37	1438.73	1438.69	0.04	1	3	3.4e+02	2	K.YKAPTDCCLALK.H
74	733.43	1464.84	1464.81	0.03	0	27	1.4	1	K.VAVVNPQPQLWSK.T
79	509.61	1525.82	1525.79	0.03	1	30	0.57	1	K.QLYTNYQEALKR.T
80	763.92	1525.83	1525.79	0.04	1	(19)	7.5	1	K.QLYTNYQEALKR.T
84	775.41	1548.81	1548.79	0.03	0	(12)	42	1	R.SYTSLMPPLSPQTK.I
86	778.90	1555.78	1555.75	0.03	0	50	0.0064	1	R.SQSTVSSIFSEAWK.R
87	783.41	1564.81	1564.78	0.03	0	58	0.0011	1	R.SYTSLMPPLSPQTK.I + Oxidation (M)
92	802.44	1602.86	1602.84	0.02	0	57	0.0015	1	K.SSLSVQPGFLADLNR.T
95	875.48	1748.95	1748.91	0.04	0	(12)	35	1	K.SPTPPAMQPLPLASQSK.A
96	881.43	1760.85	1760.81	0.04	0	53	0.0033	1	R.TESAYDWTSLSSSSIK.S
97	883.48	1764.95	1764.91	0.04	0	41	0.044	1	K.SPTPPAMQPLPLASQSK.A + Oxidation (M)
104	690.07	2067.19	2067.16	0.03	0	2	3.1e+02	1	K.LHLSGVNLPGIHQQGIVSAK.A
105	707.42	2119.23	2119.20	0.03	0	19	5.8	1	K.TVSPVVAQAVPPTPAPPVPPAK.K
106	1060.63	2119.25	2119.20	0.04	0	(11)	39	1	K.TVSPVVAQAVPPTPAPPVPPAK.K
109	725.75	2174.24	2174.21	0.03	0	40	0.053	1	K.QQSFGVKPPPSPLSPVPSVVK.Q
113	747.75	2240.21	2240.18	0.03	0	29	0.52	1	K.QIASQFPPPPTPPPVDSQPLK.S
120	852.12	2553.33	2553.30	0.03	0	24	1.5	1	R.LTQADISEQPAMTTVVPQVPTSPK.S + Oxidation (M)

2. gi|16797665 **Mass:** 16663 **Score:** 124 **Queries matched:** 2
GAP3 [Mus musculus]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
38	568.26	1134.51	1134.47	0.04	0	34	0.45	1	R.ASEDWWEGR.H
69	702.85	1403.68	1403.64	0.04	0	90	8e-07	1	K.ADSEASSGPLLDDK.A

Proteins matching the same set of peptides:

gi|20521039 **Mass:** 120952 **Score:** 123 **Queries matched:** 2
KIAA0411 [Homo sapiens]
gi|24307967 **Mass:** 125395 **Score:** 123 **Queries matched:** 2
SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3 isoform a [Homo sapiens]
gi|25535933 **Mass:** 122623 **Score:** 123 **Queries matched:** 2
KIAA0411 protein [imported] - human
gi|62648014 **Mass:** 125339 **Score:** 123 **Queries matched:** 2
PREDICTED: similar to SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 3 (srGAP3) (srGAP2) (WAVE-associated
gi|73985028 **Mass:** 125477 **Score:** 123 **Queries matched:** 2
PREDICTED: similar to SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3 [Canis familiaris]
gi|75677374 **Mass:** 122616 **Score:** 123 **Queries matched:** 2
SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3 isoform b [Homo sapiens]
gi|76665096 **Mass:** 122628 **Score:** 123 **Queries matched:** 2
PREDICTED: similar to SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3 isoform 2 [Bos taurus]
gi|76665098 **Mass:** 125507 **Score:** 123 **Queries matched:** 2

PREDICTED: similar to SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3 isoform 3 [Bos taurus]
gi|109035846 **Mass:** 125363 **Score:** 123 **Queries matched:** 2
PREDICTED: similar to SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3 isoform a isoform 1 [Macaca mulatta
gi|109035849 **Mass:** 122584 **Score:** 123 **Queries matched:** 2
PREDICTED: similar to SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3 isoform b isoform 2 [Macaca mulatta
gi|21311769 **Mass:** 125311 **Score:** 122 **Queries matched:** 2
WARP [Mus musculus]
gi|27597098 **Mass:** 111502 **Score:** 122 **Queries matched:** 2
brain stress early protein Gbi isoform 1 [Mus musculus]

5. gi|30794348 **Mass:** 24570 **Score:** 52 **Queries matched:** 2
casein alpha-S1 [Bos taurus]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
59	634.37	1266.73	1266.70	0.03	0	25	2.6	1	R.YLGYLEQLLR.L
68	692.88	1383.75	1383.72	0.03	0	27	1.3	1	R.FFVAPFPEVFGK.E

Proteins matching the same set of peptides:
gi|61658244 **Mass:** 24368 **Score:** 52 **Queries matched:** 2
alpha S1 casein [Bubalus bubalis]
gi|70905149 **Mass:** 24440 **Score:** 52 **Queries matched:** 2
alpha-S1 casein [Bubalus bubalis]

Search Parameters

Type of search : MS/MS Ion Search
Enzyme : Trypsin
Fixed modifications : Carbamidomethyl (C)
Variable modifications : Oxidation (M)
Mass values : Monoisotopic
Protein Mass : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance : ± 200 ppm
Fragment Mass Tolerance: ± 0.1 Da
Max Missed Cleavages : 1
Instrument type : ESI-QUAD-TOF
Number of queries : 121

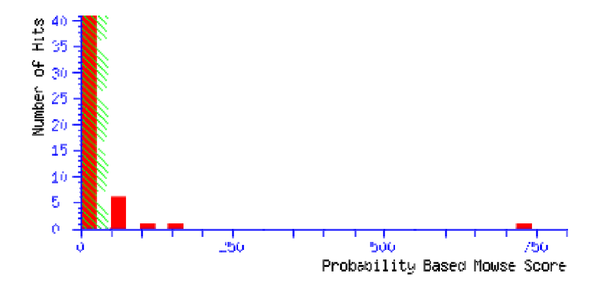
3* - CYFIP (KIAA1168; Cytoplasmic FMR1 interacting protein 1)

Mascot Search Results

User : Uwe Warnken
Email : U.Warnken@dkfz.de
Search title :
MS data file : C:\Program Files\Matrix Science\Mascot Daemon\data\060803_VE1122_3.pkl
Database : NCBInr 080606 (3841279 sequences; 1323634604 residues)
Taxonomy : Mammalia (mammals) (454192 sequences)
Timestamp : 7 Aug 2006 at 13:15:21 GMT
Significant hits: gi|6330183 KIAA1168 protein [Homo sapiens]
gi|16797665 GAP3 [Mus musculus]
gi|1644457 neural variant mena+ protein [Mus musculus]

Probability Based Mowse Score

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.
Individual ions scores > 42 indicate identity or extensive homology (p<0.05).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Archive Report of Selected Matches

1. gi|6330183 **Mass:** 150042 **Score:** 730 **Queries matched:** 23
KIAA1168 protein [Homo sapiens]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
8	483.26	964.51	964.50	0.01	0	44	0.035	1	K.TDVFQSLR.E
11	492.75	983.48	983.46	0.02	0	16	21	1	K.MYLTPSEK.H + Oxidation (M)

15	510.78	1019.55	1019.53	0.02	0	29	1.2	1	K.AMAGSVLLDK.R + Oxidation (M)
18	521.78	1041.55	1041.54	0.01	0	15	26	1	R.NFVGPPHFK.T
30	547.30	1092.59	1092.57	0.02	0	10	89	1	K.DIIEYAELK.T
43	568.80	1135.59	1135.58	0.02	0	43	0.047	1	R.TMLESLIADK.S + Oxidation (M)
48	584.35	1166.69	1166.68	0.01	0	61	0.00067	1	R.LGTPQQIAIAR.E
50	588.83	1175.65	1175.63	0.02	1	38	0.14	1	K.AMAGSVLLDKR.F + Oxidation (M)
58	605.80	1209.59	1209.58	0.01	0	38	0.14	1	R.MESVFNQAIR.N + Oxidation (M)
61	616.33	1230.64	1230.63	0.01	0	25	2.7	1	K.LADQIFAYYK.A
63	622.35	1242.69	1242.67	0.02	0	29	0.97	1	K.TVEVLEPEVTK.L
66	629.82	1257.62	1257.61	0.02	0	11	69	1	R.EFFLELTMGR.R + Oxidation (M)
68	644.34	1286.67	1286.66	0.01	0	28	1.2	1	R.TAIPFTQEPQR.D
73	681.91	1361.80	1361.79	0.01	0	75	2.7e-05	1	K.SLLQGTILQYVK.T
76	474.28	1419.82	1419.82	-0.00	0	(18)	12	1	K.YAPLHLVPLIER.L
77	710.92	1419.82	1419.82	-0.00	0	18	11	1	K.YAPLHLVPLIER.L
78	482.57	1444.69	1444.68	0.01	0	(22)	4.4	1	K.SVETDSSTVEHVR.C
79	723.35	1444.69	1444.68	0.01	0	70	8.3e-05	1	K.SVETDSSTVEHVR.C
81	728.38	1454.76	1454.75	0.01	0	44	0.026	1	K.FINMFAVLDELK.N + Oxidation (M)
84	495.23	1482.68	1482.66	0.01	0	(1)	6.2e+02	1	R.YIETSAHYEENK.S
85	742.35	1482.68	1482.66	0.02	0	34	0.28	1	R.YIETSAHYEENK.S
86	745.40	1488.78	1488.77	0.01	0	36	0.19	1	K.NYGVIIPYPPSNR.Y
91	835.90	1669.80	1669.78	0.02	0	67	0.00011	1	R.YSNSEVVTGSGLDSQK.S

Proteins matching the same set of peptides:

gi|6807649 **Mass:** 147462 **Score:** 730 **Queries matched:** 23
hypothetical protein [Homo sapiens]
gi|39104558 **Mass:** 147947 **Score:** 730 **Queries matched:** 23
mKIAA1168 protein [Mus musculus]
gi|74188573 **Mass:** 147448 **Score:** 730 **Queries matched:** 23
unnamed protein product [Mus musculus]

---

4. gi|16797665 **Mass:** 16663 **Score:** 84 **Queries matched:** 2
GAP3 [Mus musculus]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
42	568.26	1134.50	1134.47	0.03	0	27	2.3	1	R.ASEDWWEGR.H
75	702.84	1403.66	1403.64	0.02	0	56	0.0017	1	K.ADSEASSGPLLDDK.A

Proteins matching the same set of peptides:

gi|20521039 **Mass:** 120952 **Score:** 83 **Queries matched:** 2
KIAA0411 [Homo sapiens]
gi|24307967 **Mass:** 125395 **Score:** 83 **Queries matched:** 2
SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3 isoform a [Homo sapiens]
gi|25535933 **Mass:** 122623 **Score:** 83 **Queries matched:** 2
KIAA0411 protein [imported] - human
gi|62648014 **Mass:** 125339 **Score:** 83 **Queries matched:** 2
PREDICTED: similar to SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 3 (srGAP3) (srGAP2) (WAVE-associated
gi|73985028 **Mass:** 125477 **Score:** 83 **Queries matched:** 2
PREDICTED: similar to SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3 [Canis familiaris]
gi|75677374 **Mass:** 122616 **Score:** 83 **Queries matched:** 2
SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3 isoform b [Homo sapiens]
gi|76665096 **Mass:** 122628 **Score:** 83 **Queries matched:** 2
PREDICTED: similar to SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3 isoform 2 [Bos taurus]
gi|76665098 **Mass:** 125507 **Score:** 83 **Queries matched:** 2
PREDICTED: similar to SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3 isoform 3 [Bos taurus]
gi|109035846 **Mass:** 125363 **Score:** 83 **Queries matched:** 2
PREDICTED: similar to SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3 isoform a isoform 1 [Macaca mulatta
gi|109035849 **Mass:** 122584 **Score:** 83 **Queries matched:** 2
PREDICTED: similar to SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3 isoform b isoform 2 [Macaca mulatta
gi|21311769 **Mass:** 125311 **Score:** 82 **Queries matched:** 2
WARP [Mus musculus]
gi|27597098 **Mass:** 111502 **Score:** 82 **Queries matched:** 2
brain stress early protein Gbi isoform 1 [Mus musculus]

---

5. gi|1644457 **Mass:** 84067 **Score:** 78 **Queries matched:** 3
neural variant mena+ protein [Mus musculus]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
36	556.80	1111.58	1111.57	0.02	0	16	21	1	R.QVYGLNFGSK.E
45	572.29	1142.57	1142.56	0.01	0	61	0.00066	1	K.APSTSTPEPTR.K
90	532.61	1594.80	1594.78	0.02	0	1	5.4e+02	1	R.VHIYHHTGNNTFR.V

Proteins matching the same set of peptides:

gi|1644459 **Mass:** 84589 **Score:** 78 **Queries matched:** 3
neural variant mena++ protein [Mus musculus]
gi|6753754 **Mass:** 86248 **Score:** 78 **Queries matched:** 3
enabled homolog [Mus musculus]
gi|38614390 **Mass:** 59720 **Score:** 78 **Queries matched:** 3
Enah protein [Mus musculus]

Search Parameters

Type of search : MS/MS Ion Search
Enzyme : Trypsin
Fixed modifications : Carbamidomethyl (C)
Variable modifications : Oxidation (M)
Mass values : Monoisotopic

```
Protein Mass           : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance : ± 200 ppm
Fragment Mass Tolerance: ± 0.1 Da
Max Missed Cleavages   : 1
Instrument type        : ESI-QUAD-TOF
Number of queries      : 113
```

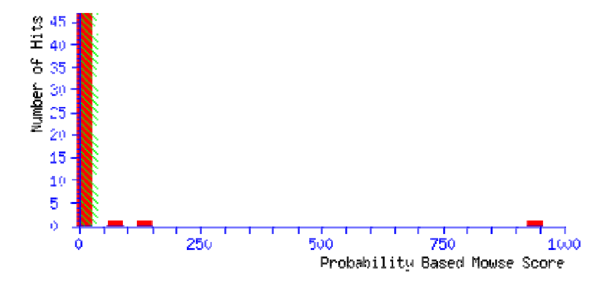
4* - Nap1 (NCK-associated protein 1)

Mascot Search Results

```
User            : Uwe Warnken
Email           : U.Warnken@dkfz.de
Search title    :
MS data file    : C:\Program Files\Matrix Science\Mascot Daemon\data\060803_VE1122_4.pkl
Database        : NCBInr 080606 (3841279 sequences; 1323634604 residues)
Taxonomy        : Mus musculus (house mouse) (100484 sequences)
Timestamp       : 7 Aug 2006 at 14:12:13 GMT
Significant hits: gi|28395023  NCK-associated protein 1 [Mus musculus]
                  gi|16797665  GAP3 [Mus musculus]
```

Probability Based Mowse Score

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.
Individual ions scores > 35 indicate identity or extensive homology (p<0.05).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Archive Report of Selected Matches

1. gi|28395023 **Mass:** 130012 **Score:** 938 **Queries matched:** 34
NCK-associated protein 1 [Mus musculus]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
2	650.37	649.36	649.38	-0.02	0	26	0.71	1	R.LYNIK.K
6	474.27	946.52	946.52	-0.00	1	55	0.00081	1	R.KFPAVETR.N
11	489.77	977.52	977.51	0.01	1	13	9.8	1	R.KYGPVMQR.Y
14	494.80	987.58	987.57	0.01	1	14	10	1	K.TISQAVNKK.S
15	495.24	988.47	988.47	-0.00	0	26	0.54	1	R.NLSADQWR.N
18	497.76	993.51	993.51	0.00	1	(8)	32	3	R.KYGPVMQR.Y + Oxidation (M)
20	507.76	1013.51	1013.55	-0.04	0	14	7.5	1	R.SVLQPSQQK.L
23	517.80	1033.58	1033.58	-0.00	0	39	0.028	1	K.AKPSYLIDK.N
25	524.76	1047.50	1047.50	-0.00	0	12	13	2	R.EKPGVESMR.K + Oxidation (M)
27	529.30	1056.59	1056.60	-0.00	0	22	1.2	1	R.DEIIWLLR.H
53	625.32	1248.62	1248.63	-0.01	1	52	0.0013	1	K.IGQETDKTTTR.N
54	630.83	1259.65	1259.65	-0.01	0	66	4.4e-05	1	R.EYLTSHLEIR.F
56	633.78	1265.54	1265.54	-0.00	0	22	1.1	1	K.MMEEFVPHSK.S + 2 Oxidation (M)
57	634.31	1266.61	1266.61	-0.00	0	35	0.053	1	K.MMNTIIFHTK.M + 2 Oxidation (M)
58	639.87	1277.72	1277.72	-0.00	0	28	0.27	1	K.EFLALASSSLLK.I
59	649.84	1297.67	1297.67	-0.01	0	47	0.0036	1	R.NNNQQLAQLQK.E
62	655.84	1309.66	1309.66	0.00	0	16	3.7	1	R.SLSELLGPYGMK.F + Oxidation (M)
64	662.80	1323.58	1323.58	-0.00	0	28	0.24	1	K.SENISPEEEYK.I
69	694.87	1387.72	1387.73	-0.01	0	41	0.013	1	K.ALFVFMALSFAR.D + Oxidation (M)
73	741.39	1480.77	1480.77	-0.00	0	18	2.7	1	K.LALQSSSCLSLFR.D
74	504.29	1509.86	1509.87	-0.01	0	(16)	4.1	1	K.AINQIAAALFTIHK.G
75	755.94	1509.86	1509.87	-0.00	0	23	0.82	1	K.AINQIAAALFTIHK.G
79	760.46	1518.90	1518.90	-0.01	1	25	0.53	1	R.LKEFLALASSSLLK.I
80	766.41	1530.80	1530.81	-0.01	0	48	0.0023	1	K.LVVENVDVLTQMR.T + Oxidation (M)
82	768.39	1534.76	1534.77	-0.01	0	78	2.1e-06	1	R.LGQMIVDYENPLK.K + Oxidation (M)
88	538.93	1613.77	1613.78	-0.01	0	(8)	21	1	R.TSFDKPDQMAALFK.R + Oxidation (M)
89	807.89	1613.77	1613.78	-0.01	0	19	1.6	1	R.TSFDKPDQMAALFK.R + Oxidation (M)
90	812.39	1622.76	1622.75	0.01	0	(22)	0.93	1	K.MFQQCLELPSQSR.Y
91	819.45	1636.89	1636.90	-0.01	0	51	0.0011	1	K.ELATVLSDQPGLLGPK.A
92	820.38	1638.75	1638.75	0.00	0	48	0.0025	1	K.MFQQCLELPSQSR.Y + Oxidation (M)
93	553.97	1658.89	1658.90	-0.01	1	23	0.76	1	K.KLVVENVDVLTQMR.T + Oxidation (M)
94	832.44	1662.86	1662.87	-0.00	1	20	1.6	1	R.LGQMIVDYENPLKK.M + Oxidation (M)
95	854.95	1707.88	1707.89	-0.00	0	18	2.5	1	K.SLSDALISLQMVYPR.R + Oxidation (M)
107	712.33	2133.96	2133.99	-0.03	0	14	5	1	K.AIIGLYNYAHEMTHGASDR.E + Oxidation (M)

---

2. gi|16797665 **Mass:** 16663 **Score:** 150 **Queries matched:** 2
GAP3 [Mus musculus]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
41	568.24	1134.47	1134.47	-0.00	0	42	0.013	1	R.ASEDWWEGR.H

70	702.82	1403.63	1403.64	-0.01	0	109	2.3e-09	1	K.ADSEASSGPLLDDK.A

Proteins matching the same set of peptides:
gi|21311769 **Mass:** 125311 **Score:** 149 **Queries matched:** 2
WARP [Mus musculus]
gi|27597098 **Mass:** 111502 **Score:** 149 **Queries matched:** 2
brain stress early protein Gbi isoform 1 [Mus musculus]

Search Parameters

```
Type of search         : MS/MS Ion Search
Enzyme                 : Trypsin
Fixed modifications    : Carbamidomethyl (C)
Variable modifications : Oxidation (M)
Mass values            : Monoisotopic
Protein Mass           : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance : ± 200 ppm
Fragment Mass Tolerance: ± 0.1 Da
Max Missed Cleavages   : 1
Instrument type        : ESI-QUAD-TOF
Number of queries      : 117
```

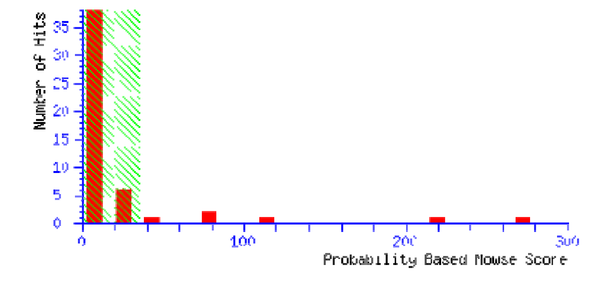
5* - WAVE-1/WASP family 1 (Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1)

Mascot Search Results

```
User           : Uwe Warnken
Email          : U.Warnken@dkfz.de
Search title   :
MS data file   : C:\Program Files\Matrix Science\Mascot Daemon\data\060803_VE1122_5.pkl
Database       : NCBInr 080606 (3841279 sequences; 1323634604 residues)
Taxonomy       : Mus musculus (house mouse) (100484 sequences)
Timestamp      : 7 Aug 2006 at 14:10:03 GMT
Significant hits: gi|758299     CW17R [Mus musculus]
                  gi|16877274   WASP family 1 [Mus musculus]
                  gi|16797665   GAP3 [Mus musculus]
                  gi|14861844   PL10 protein [Mus musculus]
                  gi|40068493   DEAD box polypeptide 17 isoform 1 [Mus musculus]
```

Probability Based Mowse Score

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.
Individual ions scores > 35 indicate identity or extensive homology (p<0.05).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Archive Report of Selected Matches

1. gi|758299 **Mass:** 59890 **Score:** 272 **Queries matched:** 10
CW17R [Mus musculus]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
36	562.78	1123.54	1123.55	-0.01	0	33	0.088	1	R.SITNTTVCTK.C
51	598.25	1194.49	1194.50	-0.01	0	24	0.68	1	R.WNQDTMEQK.T + Oxidation (M)
68	686.86	1371.70	1371.73	-0.02	0	11	15	1	R.ILRPWQSSETR.S
81	491.90	1472.68	1472.70	-0.02	0	20	1.8	1	K.FQRPGDPQSAQDK.A
84	757.84	1513.67	1513.70	-0.03	0	59	0.00017	1	K.QGIETPEDQNDLR.K
89	781.41	1560.81	1560.85	-0.04	0	66	4.1e-05	1	R.AYIVQLQIEDLTR.K
94	548.26	1641.76	1641.80	-0.03	1	19	1.9	1	K.QGIETPEDQNDLRK.M
95	824.96	1647.91	1647.94	-0.03	0	(26)	0.42	1	K.TVIPGMPTVIPPGLTR.E
96	832.96	1663.90	1663.93	-0.03	0	41	0.01	1	K.TVIPGMPTVIPPGLTR.E + Oxidation (M)
124	735.36	2937.41	2937.51	-0.10	0	0	70	1	R.HTLITEMVALNPDFKPPADYKPPATR.V + Oxidation (M)

Proteins matching the same set of peptides:
gi|2143272 **Mass:** 70819 **Score:** 272 **Queries matched:** 10

CW17 [Mus musculus]
gi|14318588 **Mass:** 68547 **Score:** 272 **Queries matched:** 10
Sf1 protein [Mus musculus]
gi|33286894 **Mass:** 59879 **Score:** 272 **Queries matched:** 10
Sf1 protein [Mus musculus]
gi|74151067 **Mass:** 68531 **Score:** 272 **Queries matched:** 10
unnamed protein product [Mus musculus]
gi|74222263 **Mass:** 68583 **Score:** 272 **Queries matched:** 10
unnamed protein product [Mus musculus]

---

2. gi|16877274 **Mass:** 61746 **Score:** 220 **Queries matched:** 8
WASP family 1 [Mus musculus]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
49	593.83	1185.64	1185.66	-0.02	0	46	0.0045	1	R.LSVSVTQLDPK.E
57	615.83	1229.64	1229.66	-0.02	0	55	0.0006	1	R.IENDVATILSR.R
64	646.84	1291.67	1291.69	-0.02	0	31	0.14	1	R.HPSTLPVISDAR.S
76	719.34	1436.67	1436.69	-0.02	0	22	0.87	1	R.SSTIQDQQLFDR.K
77	483.60	1447.77	1447.79	-0.02	1	10	16	1	K.RHPSTLPVISDAR.S
82	740.34	1478.67	1478.69	-0.02	0	13	8.5	1	K.EEELSLQDITMR.K + Oxidation (M)
104	612.30	1833.87	1833.91	-0.04	0	11	12	1	K.LAQGPELAEDDADLLHK.H
107	929.96	1857.91	1857.96	-0.05	0	31	0.1	1	K.NELECVTNISLANIIR.Q

Proteins matching the same set of peptides:
gi|18542419 **Mass:** 61772 **Score:** 220 **Queries matched:** 8
Wave1/Scar [Mus musculus]
gi|31419773 **Mass:** 61756 **Score:** 220 **Queries matched:** 8
WASP family 1 [Mus musculus]

---

3. gi|16797665 **Mass:** 16663 **Score:** 114 **Queries matched:** 2
GAP3 [Mus musculus]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
39	568.23	1134.45	1134.47	-0.02	0	57	0.00038	1	R.ASEDWWEGR.H
70	702.82	1403.62	1403.64	-0.03	0	57	0.00033	1	K.ADSEASSGPLLDDK.A

Proteins matching the same set of peptides:
gi|21311769 **Mass:** 125311 **Score:** 112 **Queries matched:** 2
WARP [Mus musculus]
gi|27597098 **Mass:** 111502 **Score:** 112 **Queries matched:** 2
brain stress early protein Gbi isoform 1 [Mus musculus]

---

4. gi|14861844 **Mass:** 73494 **Score:** 87 **Queries matched:** 3
PL10 protein [Mus musculus]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
32	547.27	1092.53	1092.55	-0.01	0	10	22	1	K.YLVLDEADR.M
38	564.82	1127.62	1127.64	-0.03	0	45	0.0057	1	K.DLLDLLVEAK.Q
63	646.35	1290.69	1290.72	-0.03	0	31	0.13	1	R.SFLLDLLNATGK.D

Proteins matching the same set of peptides:
gi|18204785 **Mass:** 73838 **Score:** 87 **Queries matched:** 3
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked [Mus musculus]
gi|74181660 **Mass:** 73795 **Score:** 87 **Queries matched:** 3
unnamed protein product [Mus musculus]
gi|94407081 **Mass:** 64423 **Score:** 87 **Queries matched:** 3
PREDICTED: similar to DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked [Mus musculus]
gi|1835122 **Mass:** 73455 **Score:** 86 **Queries matched:** 3
dead-box RNA helicase [Mus musculus]

---

6. gi|40068493 **Mass:** 73166 **Score:** 45 **Queries matched:** 3
DEAD box polypeptide 17 isoform 1 [Mus musculus]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
35	556.31	1110.60	1110.61	-0.02	0	9	21	1	K.IVDQIRPDR.Q
56	613.85	1225.68	1225.70	-0.02	0	7	38	1	K.APILIATDVASR.G
72	708.85	1415.68	1415.71	-0.03	0	29	0.2	1	K.GTAYTFFTPGNLK.Q

Proteins matching the same set of peptides:
gi|63146347 **Mass:** 72981 **Score:** 45 **Queries matched:** 3
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17 [Mus musculus]

Search Parameters

Type of search : MS/MS Ion Search
Enzyme : Trypsin
Fixed modifications : Carbamidomethyl (C)
Variable modifications : Oxidation (M)
Mass values : Monoisotopic
Protein Mass : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance : ± 200 ppm
Fragment Mass Tolerance: ± 0.1 Da
Max Missed Cleavages : 1
Instrument type : ESI-QUAD-TOF
Number of queries : 126

5.7 NCBI Referenzsequenzen

Gen / Protein	*Spezies*	*Nukleotid-Sequenz*	*Peptid-Sequenz*
MEGAP*a*	Mensch	AF427144	AAN07095
Megap	Maus	NM_080448	NP_536696
ROBO1	Mensch	NM_002941	NP_002932
Robo1	Maus	NM_019413	NP_062286
Lpd	Mensch	NM_213589	NP_998754
Lpd	Maus	NM_001045513	NP_001038978
mDia1	Mensch	NM_005219	NP_005210
mDia1	Maus	NM_007858	NP_031884
Periphilin	Mensch	NM_016488	NP_057572

5.8 Internetadressen

A Video Tour of Cell Motility http://cellix.imba.oeaw.ac.at/

Allen Institute for Brain Science http://www.brain-map.org/

Expert Protein Analysis System ExPASy http://expasy.ch/

Genepaint www.genepaint.org/

Kazusa DNA Research Institute http://www.kazusa.or.jp/e/index.html

Image Processing and Analysis in Java – ImageJ http://rsb.info.nih.gov/ij/

National Center for Biotechnology Information http://www.ncbi.nlm.nih.gov/;

NIH Gensat Project www.ncbi.nlm.nih.gov./projects/gensat/

Programm Primer3 http://frodo.wi.mit.edu/

RZPD - Ressourcenzentrum für Genomforschung http://www.rzpd-ia.de/

6 Referenzen

Alberts, B. (1998). The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. Cell *92*, 291-294.

Armstrong, L., Lako, M., van Herpe, I., Evans, J., Saretzki, G., and Hole, N. (2004). A role for nucleoprotein Zap3 in the reduction of telomerase activity during embryonic stem cell differentiation. Mech Dev *121*, 1509-1522.

Arnaout, M.A., Goodman, S.L., and Xiong, J.P. (2007). Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. Curr Opin Cell Biol *19*, 495-507.

Ayala, R., Shu, T., and Tsai, L.H. (2007). Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. Cell *128*, 29-43.

Bacon, C., Endris, V., and Rappold, G. (2009). Dynamic expression of the Slit-Robo GTPase activating protein genes during development of the murine nervous system. J Comp Neurol *513*, 224-236.

Bashaw, G.J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T., and Goodman, C.S. (2000). Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor. Cell *101*, 703-715.

Blagg, S.L., and Insall, R.H. (2004). Solving the WAVE function. Nat Cell Biol *6*, 279-281.

Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., and Kidd, T. (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. Cell *96*, 795-806.

Broussard, J.A., Webb, D.J., and Kaverina, I. (2008). Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells. Curr Opin Cell Biol *20*, 85-90.

Chang, C., Adler, C.E., Krause, M., Clark, S.G., Gertler, F.B., Tessier-Lavigne, M., and Bargmann, C.I. (2006). MIG-10/lamellipodin and AGE-1/PI3K promote axon guidance and outgrowth in response to slit and netrin. Curr Biol *16*, 854-862.

Charest, P.G., and Firtel, R.A. (2007). Big roles for small GTPases in the control of directed cell movement. Biochem J *401*, 377-390.

Chedotal, A., Kerjan, G., and Moreau-Fauvarque, C. (2005). The brain within the tumor: new roles for axon guidance molecules in cancers. Cell Death Differ *12*, 1044-1056.

Chevray, P.M., and Nathans, D. (1992). Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 5789-5793.

Dent, E.W., and Gertler, F.B. (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. Neuron *40*, 209-227.

Dickson, B.J. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. Science *298*, 1959-1964.

Dickson, B.J., and Gilestro, G.F. (2006). Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its Robo receptors. Annu Rev Cell Dev Biol *22*, 651-675.

Drees, B., Friederich, E., Fradelizi, J., Louvard, D., Beckerle, M.C., and Golsteyn, R.M. (2000). Characterization of the interaction between zyxin and members of the Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein family of proteins. J Biol Chem *275*, 22503-22511.

Du, W., Vidal, M., Xie, J.E., and Dyson, N. (1996). RBF, a novel RB-related gene that regulates E2F activity and interacts with cyclin E in Drosophila. Genes Dev *10*, 1206-1218.

Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., and Kirschner, M.W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. Nature *418*, 790-793.

Eichenbaum, H. (2004). Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. Neuron *44*, 109-120.

Endris, V., Haussmann, L., and Rappold, G. (2009). Abl-dependent Phosphorylation of MEGAP/srGAP3 affects its binding to WAVE-1. submitted.

Endris, V., Wogatzky, B., Leimer, U., Bartsch, D., Zatyka, M., Latif, F., Maher, E.R., Tariverdian, G., Kirsch, S., Karch, D., and Rappold, G.A. (2002). The novel Rho-GTPase activating gene MEGAP/ srGAP3 has a putative role in severe mental retardation. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 11754-11759.

Faix, J., and Grosse, R. (2006). Staying in shape with formins. Dev Cell *10*, 693-706.

Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature *340*, 245-246.

Frangioni, J.V., and Neel, B.G. (1993). Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. Anal Biochem *210*, 179-187.

Gertler, F.B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J., and Soriano, P. (1996). Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. Cell *87*, 227-239.

Ghashghaei, H.T., Lai, C., and Anton, E.S. (2007). Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? Nat Rev Neurosci *8*, 141-151.

Gleeson, J.G., Allen, K.M., Fox, J.W., Lamperti, E.D., Berkovic, S., Scheffer, I., Cooper, E.C., Dobyns, W.B., Minnerath, S.R., Ross, M.E., and Walsh, C.A. (1998). Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. Cell *92*, 63-72.

Grigoriev, A. (2003). On the number of protein-protein interactions in the yeast proteome. Nucleic Acids Res *31*, 4157-4161.

Gupta, A., Tsai, L.H., and Wynshaw-Boris, A. (2002). Life is a journey: a genetic look at neocortical development. Nat Rev Genet *3*, 342-355.

Hartley, J.L., Temple, G.F., and Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. Genome Res *10*, 1788-1795.

Haussmann, L., Endris, V., Bacon, C., Pinheiro, E., Gertler, F.B., and Rappold, G. (2009). MEGAP inhibits actin dynamics and affects the localization of the Ena/VASP binding protein Lamellipodin. in preparation.

Hedberg, K.M., Bengtsson, T., Safiejko-Mroczka, B., Bell, P.B., and Lindroth, M. (1993). PDGF and neomycin induce similar changes in the actin cytoskeleton in human fibroblasts. Cell Motil Cytoskeleton *24*, 139-149.

Hengen, P.N. (1997). False positives from the yeast two-hybrid system. Trends Biochem Sci *22*, 33-34.

Higashi, T., Ikeda, T., Shirakawa, R., Kondo, H., Kawato, M., Horiguchi, M., Okuda, T., Okawa, K., Fukai, S., Nureki, O., Kita, T., and Horiuchi, H. (2008). Biochemical characterization of the Rho GTPase-regulated actin assembly by diaphanous-related formins, mDia1 and Daam1, in platelets. J Biol Chem *283*, 8746-8755.

Higgs, H.N. (2005). Formin proteins: a domain-based approach. Trends Biochem Sci *30*, 342-353.

Hinck, L. (2004). The versatile roles of "axon guidance" cues in tissue morphogenesis. Dev Cell *7*, 783-793.

Hinz, B., Alt, W., Johnen, C., Herzog, V., and Kaiser, H.W. (1999). Quantifying lamella dynamics of cultured cells by SACED, a new computer-assisted motion analysis. Exp Cell Res *251*, 234-243.

Hoffman, C.S., and Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli. Gene *57*, 267-272.

Hohenester, E. (2008). Structural insight into Slit-Robo signalling. Biochem Soc Trans *36*, 251-256.

Horesh, D., Sapir, T., Francis, F., Wolf, S.G., Caspi, M., Elbaum, M., Chelly, J., and Reiner, O. (1999). Doublecortin, a stabilizer of microtubules. Hum Mol Genet *8*, 1599-1610.

Humphries, J.D., Wang, P., Streuli, C., Geiger, B., Humphries, M.J., and Ballestrem, C. (2007). Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. J Cell Biol *179*, 1043-1057.

Keller, R., Davidson, L., Edlund, A., Elul, T., Ezin, M., Shook, D., and Skoglund, P. (2000). Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci *355*, 897-922.

Kelly, W., and Stumpf, M. (2008). Protein-protein interactions: from global to local analyses. Curr Opin Biotechnol *19*, 396-403.

Kerrien, S., Alam-Faruque, Y., Aranda, B., Bancarz, I., Bridge, A., Derow, C., Dimmer, E., Feuermann, M., Friedrichsen, A., Huntley, R., Kohler, C., Khadake, J., Leroy, C., Liban, A., Lieftink, C., Montecchi-Palazzi, L., Orchard, S., Risse, J., Robbe, K., Roechert, B.,

Thorneycroft, D., Zhang, Y., Apweiler, R., and Hermjakob, H. (2007). IntAct--open source resource for molecular interaction data. Nucleic Acids Res *35*, D561-565.

Kramer, A. (1992). Purification of splicing factor SF1, a heat-stable protein that functions in the assembly of a presplicing complex. Mol Cell Biol *12*, 4545-4552.

Krause, M., Dent, E.W., Bear, J.E., Loureiro, J.J., and Gertler, F.B. (2003). Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. Annu Rev Cell Dev Biol *19*, 541-564.

Krause, M., Leslie, J.D., Stewart, M., Lafuente, E.M., Valderrama, F., Jagannathan, R., Strasser, G.A., Rubinson, D.A., Liu, H., Way, M., Yaffe, M.B., Boussiotis, V.A., and Gertler, F.B. (2004). Lamellipodin, an Ena/VASP ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics. Dev Cell *7*, 571-583.

Krebs, A., Rothkegel, M., Klar, M., and Jockusch, B.M. (2001). Characterization of functional domains of mDia1, a link between the small GTPase Rho and the actin cytoskeleton. J Cell Sci *114*, 3663-3672.

Kurokawa, K., and Matsuda, M. (2005). Localized RhoA activation as a requirement for the induction of membrane ruffling. Mol Biol Cell *16*, 4294-4303.

Kurosaka, S., and Kashina, A. (2008). Cell biology of embryonic migration. Birth Defects Res C Embryo Today *84*, 102-122.

Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. Annu Rev Biochem *58*, 913-949.

Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. Cell *84*, 359-369.

Le Clainche, C., and Carlier, M.F. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. Physiol Rev *88*, 489-513.

Lein, E.S., Hawrylycz, M.J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A.F., Boguski, M.S., Brockway, K.S., Byrnes, E.J., Chen, L., Chen, L., Chen, T.M., Chin, M.C., Chong, J., Crook, B.E., Czaplinska, A., Dang, C.N., Datta, S., Dee, N.R., Desaki, A.L., Desta, T., Diep, E., Dolbeare, T.A., Donelan, M.J., Dong, H.W., Dougherty, J.G., Duncan, B.J., Ebbert, A.J., Eichele, G., Estin, L.K., Faber, C., Facer, B.A., Fields, R., Fischer, S.R., Fliss, T.P., Frensley, C., Gates, S.N., Glattfelder, K.J., Halverson, K.R., Hart, M.R., Hohmann, J.G., Howell, M.P., Jeung, D.P., Johnson, R.A., Karr, P.T., Kawal, R., Kidney, J.M., Knapik, R.H., Kuan, C.L., Lake, J.H., Laramee, A.R., Larsen, K.D., Lau, C., Lemon, T.A., Liang, A.J., Liu, Y., Luong, L.T., Michaels, J., Morgan, J.J., Morgan, R.J., Mortrud, M.T., Mosqueda, N.F., Ng, L.L., Ng, R., Orta, G.J., Overly, C.C., Pak, T.H., Parry, S.E., Pathak, S.D., Pearson, O.C., Puchalski, R.B., Riley, Z.L., Rockett, H.R., Rowland, S.A., Royall, J.J., Ruiz, M.J., Sarno, N.R., Schaffnit, K., Shapovalova, N.V., Sivisay, T., Slaughterbeck, C.R., Smith, S.C., Smith, K.A., Smith, B.I., Sodt, A.J., Stewart, N.N., Stumpf, K.R., Sunkin, S.M., Sutram, M., Tam, A., Teemer, C.D., Thaller, C., Thompson, C.L., Varnam, L.R., Visel, A., Whitlock, R.M., Wohnoutka, P.E., Wolkey, C.K., Wong, V.Y., Wood, M., Yaylaoglu, M.B., Young, R.C., Youngstrom, B.L., Yuan, X.F., Zhang, B., Zwingman, T.A., and Jones, A.R. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. Nature *445*, 168-176.

Li, S.S. (2005). Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. Biochem J *390*, 641-653.

Locascio, A., and Nieto, M.A. (2001). Cell movements during vertebrate development: integrated tissue behaviour versus individual cell migration. Curr Opin Genet Dev *11*, 464-469.

Lock, J.G., Wehrle-Haller, B., and Stromblad, S. (2008). Cell-matrix adhesion complexes: master control machinery of cell migration. Semin Cancer Biol *18*, 65-76.

Long, H., Sabatier, C., Ma, L., Plump, A., Yuan, W., Ornitz, D.M., Tamada, A., Murakami, F., Goodman, C.S., and Tessier-Lavigne, M. (2004). Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. Neuron *42*, 213-223.

Machesky, L.M., Mullins, R.D., Higgs, H.N., Kaiser, D.A., Blanchoin, L., May, R.C., Hall, M.E., and Pollard, T.D. (1999). Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 3739-3744.

Marin, O., and Rubenstein, J.L. (2001). A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. Nat Rev Neurosci *2*, 780-790.

Marin, O., and Rubenstein, J.L. (2003). Cell migration in the forebrain. Annu Rev Neurosci *26*, 441-483.

Mattila, P.K., and Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. Nat Rev Mol Cell Biol *9*, 446-454.

Mayer, B.J. (2001). SH3 domains: complexity in moderation. J Cell Sci *114*, 1253-1263.

Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., and Ogawa, M. (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. Neuron *31*, 727-741.

Nadarajah, B., Brunstrom, J.E., Grutzendler, J., Wong, R.O., and Pearlman, A.L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. Nat Neurosci *4*, 143-150.

Ozmen, M., Yilmaz, Y., Caliskan, M., Minareci, O., and Aydinli, N. (2000). Clinical features of 21 patients with lissencephaly type I (agyria-pachygyria). Turk J Pediatr *42*, 210-214.

Pertz, O.C., Wang, Y., Yang, F., Wang, W., Gay, L.J., Gristenko, M.A., Clauss, T.R., Anderson, D.J., Liu, T., Auberry, K.J., Camp, D.G., 2nd, Smith, R.D., and Klemke, R.L. (2008). Spatial mapping of the neurite and soma proteomes reveals a functional Cdc42/Rac regulatory network. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 1931-1936.

Plachez, C., and Richards, L.J. (2005). Mechanisms of axon guidance in the developing nervous system. Curr Top Dev Biol *69*, 267-346.

Plattner, R., Kadlec, L., DeMali, K.A., Kazlauskas, A., and Pendergast, A.M. (1999). c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF. Genes Dev *13*, 2400-2411.

Pollard, T.D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. Annu Rev Biophys Biomol Struct *36*, 451-477.

Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. Cell *112*, 453-465.

Ponti, A., Machacek, M., Gupton, S.L., Waterman-Storer, C.M., and Danuser, G. (2004). Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. Science *305*, 1782-1786.

Quinn, C.C., Pfeil, D.S., Chen, E., Stovall, E.L., Harden, M.V., Gavin, M.K., Forrester, W.C., Ryder, E.F., Soto, M.C., and Wadsworth, W.G. (2006). UNC-6/netrin and SLT-1/slit guidance cues orient axon outgrowth mediated by MIG-10/RIAM/lamellipodin. Curr Biol *16*, 845-853.

Quinn, C.C., Pfeil, D.S., and Wadsworth, W.G. (2008). CED-10/Rac1 mediates axon guidance by regulating the asymmetric distribution of MIG-10/lamellipodin. Curr Biol *18*, 808-813.

Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. J Comp Neurol *145*, 61-83.

Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustinella, F., Dobyns, W.B., Caskey, C.T., and Ledbetter, D.H. (1993). Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. Nature *364*, 717-721.

Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. Science *302*, 1704-1709.

Rodal, A.A., Sokolova, O., Robins, D.B., Daugherty, K.M., Hippenmeyer, S., Riezman, H., Grigorieff, N., and Goode, B.L. (2005). Conformational changes in the Arp2/3 complex leading to actin nucleation. Nat Struct Mol Biol *12*, 26-31.

Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., and Kirschner, M.W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. Cell *97*, 221-231.

Sabatier, C., Plump, A.S., Le, M., Brose, K., Tamada, A., Murakami, F., Lee, E.Y., and Tessier-Lavigne, M. (2004). The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. Cell *117*, 157-169.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science *230*, 1350-1354.

Salazar, M.A., Kwiatkowski, A.V., Pellegrini, L., Cestra, G., Butler, M.H., Rossman, K.L., Serna, D.M., Sondek, J., Gertler, F.B., and De Camilli, P. (2003). Tuba, a novel protein containing bin/amphiphysin/Rvs and Dbl homology domains, links dynamin to regulation of the actin cytoskeleton. J Biol Chem *278*, 49031-49043.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A *74*, 5463-5467.

Sapir, T., Elbaum, M., and Reiner, O. (1997). Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. Embo J *16*, 6977-6984.

Sauka-Spengler, T., and Bronner-Fraser, M. (2008). A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. Nat Rev Mol Cell Biol *9*, 557-568.

Sini, P., Cannas, A., Koleske, A.J., Di Fiore, P.P., and Scita, G. (2004). Abl-dependent tyrosine phosphorylation of Sos-1 mediates growth-factor-induced Rac activation. Nat Cell Biol *6*, 268-274.

Soderling, S.H., Binns, K.L., Wayman, G.A., Davee, S.M., Ong, S.H., Pawson, T., and Scott, J.D. (2002). The WRP component of the WAVE-1 complex attenuates Rac-mediated signalling. Nat Cell Biol *4*, 970-975.

Soderling, S.H., Guire, E.S., Kaech, S., White, J., Zhang, F., Schutz, K., Langeberg, L.K., Banker, G., Raber, J., and Scott, J.D. (2007). A WAVE-1 and WRP signaling complex regulates spine density, synaptic plasticity, and memory. J Neurosci *27*, 355-365.

Takahashi, M., Rikitake, Y., Nagamatsu, Y., Hara, T., Ikeda, W., Hirata, K., and Takai, Y. (2008). Sequential activation of Rap1 and Rac1 small G proteins by PDGF locally at leading edges of NIH3T3 cells. Genes Cells *13*, 549-569.

Tamamaki, N., Nakamura, K., Okamoto, K., and Kaneko, T. (2001). Radial glia is a progenitor of neocortical neurons in the developing cerebral cortex. Neurosci Res *41*, 51-60.

Trichet, L., Sykes, C., and Plastino, J. (2008). Relaxing the actin cytoskeleton for adhesion and movement with Ena/VASP. J Cell Biol *181*, 19-25.

Ulke-Lemee, A., Trinkle-Mulcahy, L., Chaulk, S., Bernstein, N.K., Morrice, N., Glover, M., Lamond, A.I., and Moorhead, G.B. (2007). The nuclear PP1 interacting protein ZAP3 (ZAP) is a putative nucleoside kinase that complexes with SAM68, CIA, NF110/45, and HNRNP-G. Biochim Biophys Acta *1774*, 1339-1350.

Van Criekinge, W., and Beyaert, R. (1999). Yeast Two-Hybrid: State of the Art. Biol Proced Online *2*, 1-38.

Vidal, M., Brachmann, R.K., Fattaey, A., Harlow, E., and Boeke, J.D. (1996). Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 10315-10320.

Volkmann, N., Amann, K.J., Stoilova-McPhie, S., Egile, C., Winter, D.C., Hazelwood, L., Heuser, J.E., Li, R., Pollard, T.D., and Hanein, D. (2001). Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions. Science *293*, 2456-2459.

Wallar, B.J., and Alberts, A.S. (2003). The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. Trends Cell Biol *13*, 435-446.

Waltereit, R., Kautt, S., and Bartsch, D. (2008a). Expression of MEGAP mRNA during embryonic development. Gene Expr Patterns *8*, 307-310.

Waltereit, R., Leimer, U., Endris, V., von Bohlen und Halbach, O., Panke, J., Baier, V., Till, S., Haderer, J., Kutscherjawy, S., Nescholta, S., Sartorius, A., Rappold, G., Bartsch, D., and Hrabé de Angelis, M. (2008b). Characterisation of MEGAP/srGAP3 mental retardation mouse model-249.13. In: Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington.

Watanabe, N., and Mitchison, T.J. (2002). Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia. Science *295*, 1083-1086.

Watanabe, T., Noritake, J., and Kaibuchi, K. (2005). Regulation of microtubules in cell migration. Trends Cell Biol *15*, 76-83.

Westphal, R.S., Soderling, S.H., Alto, N.M., Langeberg, L.K., and Scott, J.D. (2000). Scar/WAVE-1, a Wiskott-Aldrich syndrome protein, assembles an actin-associated multi-kinase scaffold. Embo J *19*, 4589-4600.

Wong, K., Ren, X.R., Huang, Y.Z., Xie, Y., Liu, G., Saito, H., Tang, H., Wen, L., Brady-Kalnay, S.M., Mei, L., Wu, J.Y., Xiong, W.C., and Rao, Y. (2001). Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. Cell *107*, 209-221.

Yam, P.T., Wilson, C.A., Ji, L., Hebert, B., Barnhart, E.L., Dye, N.A., Wiseman, P.W., Danuser, G., and Theriot, J.A. (2007). Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility. J Cell Biol *178*, 1207-1221.

Yang, Y., Marcello, M., Endris, V., Saffrich, R., Fischer, R., Trendelenburg, M.F., Sprengel, R., and Rappold, G. (2006). MEGAP impedes cell migration via regulating actin and microtubule dynamics and focal complex formation. Exp Cell Res *312*, 2379-2393.

Yu, J., Moon, A., and Kim, H.R. (2001). Both platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)-alpha and PDGFR-beta promote murine fibroblast cell migration. Biochem Biophys Res Commun *282*, 697-700.

Yu, J.C., Gutkind, J.S., Mahadevan, D., Li, W., Meyers, K.A., Pierce, J.H., and Heidaran, M.A. (1994). Biological function of PDGF-induced PI-3 kinase activity: its role in alpha PDGF receptor-mediated mitogenic signaling. J Cell Biol *127*, 479-487.